



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Identificación de dianas terapéuticas en fibrosis hepática y cáncer

Anna Tutusaus López

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS TERAPÉUTICAS EN FIBROSIS HEPÁTICA Y CÁNCER

Anna Tutusaus López

Barcelona 2018



UNIVERSITAT DE
BARCELONA
Doctorado en Biomedicina
Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

IDENTIFICACIÓN DE DIANAS TERAPÉUTICAS EN FIBROSIS HEPÁTICA Y CÁNCER

Memoria presentada por

Anna Tutusaus López

para optar al título de Doctor en Biomedicina
bajo la dirección de la Dra. Montserrat Marí y el Dr. Albert Morales en el Departamento de
Muerte y Proliferación Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona
(IIBB-CSIC)



Dra. Montserrat Marí
Directora

Dr. Albert Morales
Director

Dr. Carles Enrich
Tutor

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría agradecer a Albert y Montse por acogerme en su laboratorio y darme la oportunidad de descubrir en la investigación hepática. Su supervisión y apoyo han sido esenciales para la realización de esta tesis, y su determinación junto a Anna han permitido consolidar nuestro pequeño grupo de investigación.

También me gustaría recordar a mis primeros compañeros, Cristina, Álvaro, Bet y sobretodo Milica, que me transmitió todos sus conocimientos sobre el hepatocarcinoma, así como a Anna Baulies, Cris, Sandra, Susana y Vicent por ayudarme en la primera etapa del doctorado.

Cuando empezaba a quedarme sola, desde un lugar de la Mancha llegó Estefanía. A su lado las extracciones, tinciones etc. son mucho más entretenidas por no hablar de las pausas de café o del pis de pitufo. Al resto de grupo, Blanca, Vicente y Cris así como a los integrantes temporales (Aynara, Laura, Justyna y Sílvia) gracias por hacer el trabajo más ameno y poder compartir cenas, cervezas, vías ferratas un poco accidentadas y algún baile en la feria de abril.

A la Neus, la Clara, la Carme i el Joan els hi voldria agrair la seva amabilitat i ajuda durant el procés d'adaptació després del trasllat i per acollir-me al laboratori 613 que ara ja és com casa meva. També a l'Andrés i el Lucas que durant la seva curta estada van animar el laboratori. A Pablo i els qui han passat pel seu laboratori (Guillem, Manel, Helena i Cristina Aresté) que m'han ajudat amb els ELISAS i els animals KO i amb qualsevol reactiu que necessités. Gracias a Rocío por mantenerme informada durante nuestros cafés y a todo el IIBB y todos con los que he compartido conversación en la cantina y en nuestras casas rurales.

Fuera del laboratorio no puedo olvidarme de las Ukelelas, María, Anahí, Luz, Claudia, Mireia y Gretsén, que desde diferentes puntos del mundo son siempre un gran apoyo y unas estupendas compañeras de viaje.

El doctorat no hagués sigut el mateix sense els estius a Begur, el sopars a base de sushi amb les Trempolines, Marta x2, Neus (que repeteix) i la recent Doctora Míriam.

A l'Alba i el Carlos amb qui espero compartir molts més concerts, festivals, vermouths i, com no, molts *Fin de Año Fake!*

A David por estar a mi lado y por llevarme lejos del trabajo mental y físicamente. Nos esperan muchos Shinrin-yoku juntos.

Per últim, a tota la meva família, que no és petita, a la que estimo incondicionalment, i amb qui espero gaudir molts dinars/sopars tot i el gran risc d'empatx. A la meva germana per estar sempre al meu costat i pels karaokes al cotxe i especialment als meus pares que m'ho han donat tot i més.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
Introducción.....	11
1 <i>El hígado</i>	13
1.1 Estructura y función	13
1.2 Células hepáticas.....	14
1.2.1 Hepatocitos	14
1.2.2 Células estrelladas	14
1.2.3 Células de Kupffer	15
1.2.4 Células endoteliales sinusoidales	15
1.3 Enfermedades hepáticas	16
2 <i>Esteatohepatitis no alcohólica</i>	16
2.1 Patogénesis de la EHNA: teoría del múltiple impacto	16
2.1.1 Factores genéticos	16
2.1.2 Lípidos y lipotoxicidad.....	17
2.1.3 Resistencia a insulina y tejido adiposo.....	17
2.1.4 Eje intestino-hígado.....	18
2.2 Progresión y regresión de la fibrosis hepática.....	19
2.2.1 Progresión de la fibrosis hepática.....	19
2.2.2 Resolución de la fibrosis hepática.....	20
2.3 Diagnóstico y tratamientos del EHNA	20
2.4 Modelos animales en el estudio del EHNA	22
3 <i>Los receptores TAM y sus ligandos</i>	23
3.1 Estructura de los receptores TAM y sus ligandos	23
3.2 Activación de los receptores TAM.....	24
3.3 Funciones de los receptores TAM.....	25
3.3.1 Control de la inflamación	25
3.3.2 Regulación de la eferocitosis	25
3.3.3 Otras funciones de los TAM y sus ligandos.	26
3.4 GAS6 y receptores TAM en hígado	27
3.4.1 TAM y enfermedades hepáticas agudas.....	28
3.4.2 TAM y enfermedades hepáticas crónicas	28
3.5 Aplicación terapéutica	29
4 <i>Carcinoma hepatocelular</i>	30
4.1 Epidemiología y etiología	30
4.2 Patogénesis y mecanismos moleculares	30
4.2.1 Diferenciación celular y desarrollo	31
4.2.2 Supervivencia y proliferación celular.....	32
4.2.3 Angiogénesis.....	32
4.2.4 Inflamación y microambiente tumoral.....	33
4.3 Estrategias terapéuticas.....	34
4.3.1 Diagnóstico y tratamiento del CHC	34
4.3.2 Inhibidores de receptores tirosina quinasa.....	36
5 <i>Mecanismos de muerte celular</i>	38
5.1 Apoptosis	38

5.2	Muerte celular independiente de caspasa.....	39
6	<i>Metabolismo de esfingolípidos</i>	40
6.1	Estructura y metabolismo de los esfingolípidos.....	40
6.2	Funciones y señalización regulada por esfingolípidos.....	40
6.2.1	Funciones en la membrana celular.....	41
6.2.2	Respuesta inmunitaria.....	42
6.2.3	Migración celular.....	42
6.2.4	Proliferación y senescencia.....	42
6.2.5	Autofagia.....	42
6.2.6	Muerte celular.....	42
1.3	Esfingolípidos y cáncer.....	43
6.2.7	Metabolismo esfingolípido en cáncer.....	43
6.2.8	Implicaciones en terapia.....	43
7	<i>Familia de proteínas Bcl-2</i>	44
7.1	Estructura y función.....	44
7.2	Bcl-2 en cáncer.....	46
7.3	Bcl-2 y estrategia terapéutica.....	47
7.3.1	Adición a Bcl-2.....	47
7.3.2	Miméticos de BH3.....	47
	Objetivos	51
	Materiales y métodos	55
1.	Reactivos.....	57
2.	Cultivos celulares.....	58
3.	Ensayos de viabilidad y clonogénicos.....	58
4.	Extracción y cuantificación de proteínas.....	59
5.	Western Blot.....	59
6.	Extracción de ARN.....	60
7.	RT y qPCR.....	60
8.	Transfección siARN y vectores de expresión.....	62
9.	Ensayo de cierre de herida (wound healing assay).....	63
10.	Análisis del potencial de membrana mitocondrial con JC-1.....	63
11.	Determinación de los niveles de ROS.....	63
12.	Ensayo de actividad caspasa 3.....	63
13.	Cuantificación de mitocondrias.....	64
14.	Hoechst.....	64
15.	Ensayo de actividad del complejo I, GAPDH y cuantificación de ATP.....	64
16.	Array génico.....	65
17.	Modelos animales.....	65
17.1.	Modelos de EHNA.....	65
17.2.	Modelos de CHC.....	66
18.	Determinaciones bioquímicas.....	66
19.	Histologías.....	66
19.1.	Inclusión en parafina.....	66
19.2.	Tinción HE.....	67
19.3.	Tinción sirius red.....	67
19.4.	Inmunohistoquímicas.....	67

19.5. Inmunofluorescencia:.....	68
19.6. Tunnel	68
20. Cuantificación de hidroxiprolina	69
21. Ensayos ELISAs	69
22. Muestras humanas.....	70
23. Estadística	70
Resultados	73
Resultados 1: La inhibición de AXL reduce la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica en modelos animales.	77
Resultados 2: La actuación sobre la sobreexpresión de la glucosilceramida sintasa revierte la resistencia en modelos animales de carcinoma hepatocelular.	101
Resultados 3. Las proteínas Bcl-2 determinan la resistencia a sorafenib y regorafenib y la eficacia de los miméticos BH3 en el carcinoma hepatocelular.	135
Discusión	163
Conclusiones.....	173
Bibliografía.....	177
ANEXO.....	201

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Estructura del lobulillo hepático.....	13
Figura 2: Activación de las células estrelladas hepáticas.....	15
Figura 3: Interacción entre las células hepáticas en EHNA.....	18
Tabla 1: Sistema de puntuación NAS para la estratificación de pacientes.....	21
Figura 4: Estructura de los receptores TAM y sus ligandos.....	24
Tabla 2: Inhibidores de AXL en fase clínica.....	29
Figura 5: Desarrollo del CHC en hígados cirróticos y no cirróticos.....	31
Figura 6: Sistema BCLC de estratificación de pacientes con CHC.....	34
Tabla 3: Tratamiento sistémico del CHC avanzado.....	35
Figura 7: Dianas del sorafenib.....	37
Figura 8: Muerte celular dependiente e independiente de caspasa.....	39
Figura 9: Metabolismo de los esfingolípidos.....	41
Figura 10: Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2.....	45
Figura 11: Interacción entre proteínas de la familia Bcl-2.....	46
Figura 12: Resumen esquemático del efecto de la inhibición de AXL en EHNA.....	167

ABREVIATURAS:

α-SMA:	actina del músculo liso (<i>smooth muscle actin</i>)
AAV2:	virus adeno-asociados 2
ACDasa:	ceramidasa ácida
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AIF:	factor inductor de apoptosis (<i>Apoptosis inducing factor</i>)
AKT:	proteína quinasa B
ALT:	alanina aminotransferasa
APAF1:	factor activador de peptidasa apoptótica 1 (<i>Apoptosis protease-activating factor-1</i>)
ARN:	ácido ribonucleico
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ASMasa:	esfingomielinasa ácida
ATP:	adenosina trifosfato (<i>adenosine triphosphate</i>)
BAD:	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
BAK:	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
BAMBI:	<i>BMP and activin membrane bound inhibitor</i>
BAX:	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL2:	<i>B-cell lymphoma 2 protein</i>
BCLC:	Barcelona Clinic Liver Cancer
BID:	<i>BH3 interacting-domain death agonist</i>
BMF:	<i>Bcl-2-modifying factor</i>
CCL:	ligando de quimioquinas CC (<i>Chemokine (C-C motif) ligand</i>)
CCl₄:	tetracloruro de carbono
CCR:	receptor de quimioquinas CC (<i>Chemokine (C-C motif) receptor</i>)
CD:	deficiente en colina (choline deficient)
CDAA:	deficiente en colina, aminoácidos definida (<i>choline-deficient, L-aminoacid-defined</i>)
CDasa:	ceramidasa
CEH:	célula estrellada hepática
CER:	proteína de transferencia de ceramida (<i>ceramide transfer protein</i>)
CerS:	ceramida sintasas
CHC:	carcinoma hepatocelular
CICD:	muerte celular independiente de caspasa (<i>caspase-independent cell death</i>)
COX2:	ciclooxigenasa 2
CTGF:	factor de crecimiento del tejido conectivo (<i>connective tissue growth factor</i>)
DAMPS:	patrones moleculares asociados al daño (<i>Damage-associated molecular patterns</i>)
EGF:	factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor</i>)

ABREVIATURAS

EGFR:	receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
EHGNA:	enfermedad del hígado graso no alcohólica
EHNA:	esteatohepatitis no alcohólica
endoG:	endonucleasa G
ERK:	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FADD:	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
FGF:	factor de crecimiento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor</i>)
FGFR:	receptores del factor de crecimiento de fibroblastos (<i>fibroblast growth factor receptors</i>)
FXR:	receptor X fernesioide
GCS:	glucosilceramida sintasas (<i>glucosylceramide synthase</i>)
H₂O₂:	peróxido de hidrógeno
HGDNs:	nódulos con displasia de alto grado (<i>high grade dysplastic nodules</i>)
HGF:	factor de crecimiento de hepatocitos (<i>Hepatocyte growth factor</i>)
HRK:	<i>Activator of apoptosis harakiri protein</i>
HUVEC:	células endoteliales de la vena umbilical humana (<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)
IGF-1R:	receptor del factor factor de crecimiento insulínico 1 (<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>)
IL-1:	interleuquina 1
IL-6:	interleuquina 6
IMIP:	imipramina
JNK:	quinasas c-Jun N-terminal
LGDNs:	nódulos con displasia de bajo grado (<i>low grade dysplastic nodules</i>)
LLC:	leucemia linfocítica crónica
LSEC:	células endoteliales sinusoidales (<i>liver sinusoidal endothelial cell</i>)
MAPK:	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCD:	deficiente en metionina y colina (<i>methionine and choline deficient</i>)
MCL-1:	<i>myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
MCP-1:	proteína quimioatrayente de monocitos 1 (<i>monocytes chemoattractant protein 1</i>) o CCL2
MDR1:	glicoproteína P/gen de resistencia a multidroga (<i>multiple drug resistance gene</i>)
MEC:	matriz extracelular
MMP:	metaloproteinasas
MOMP:	permeabilización de la membrana mitocondrial externa (<i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
MTT:	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
MYR:	miriocina
NAS	<i>NAFLD Activity Score</i>
NCDasa:	ceramidasa neutra
NF-κB:	factor nuclear kappa B

NLR:	receptor tipo Nod (<i>Nod-like receptor</i>)
NO:	monóxido de nitrógeno
NOE:	N-oleoil etanolamina. Inhibidor de ACDasa
O₂⁻:	superóxido
PAMPS:	patrones moleculares asociados a patógenos (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PCNA:	antígeno nuclear de células en proliferación (<i>proliferating cell nuclear antigen</i>)
PDGF:	factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor</i>)
PDGFR:	receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet derived growth factor receptor</i>)
PDMP:	1-fenil-2-decanoilamino-3morfolino-1-propanol. Inhibidor de GCS
PI3K:	fosfoinositol 3-quinasas
PROS:	proteína S
PUMA:	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis protein</i>
RANTES:	quimioquina CCL5 (<i>Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted</i>)
RET:	receptor tirosina-quinasa de la familia GDNF
ROS:	especies de oxígeno reactivo (<i>reactive oxygen species</i>)
S1P:	esfingosina-1-fosfato
S1PR:	receptor de la esfingosina-1-fosfato
SHBG:	dominio globulina transportadora de hormonas sexuales (<i>sex hormone-binding globulin</i>)
SK1:	esfingosina quinasa
SMAC:	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SMasas:	esfingomielinasas
SOCS:	proteína supresora de la señalización por citoquinas (<i>suppressor of cytokine signaling</i>)
SPT:	palmitoiltransferasa serina
TERT:	telomerasa transcriptasa inversa (<i>telomerase reverse transcriptase</i>)
TGF-β:	factor de crecimiento transformante beta (<i>transforming growth factor beta</i>)
TIE:	receptores de angiopietina (<i>angiopoietin receptors</i>)
TIMP:	inhibidores tisulares de metaloproteinasas (<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>)
TLR:	receptores tipo Toll (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF:	factor de necrosis tumoral (<i>tumoral necrosis factor</i>)
TRADD:	<i>TNF receptor type 1-associated DEATH domain</i>
TRAIL:	ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
UPR:	respuesta a proteínas desplegadas (<i>unfolded protein response</i>)
VEGF:	factor de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
VEGFR:	receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (<i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
VHB:	virus de la hepatitis B
VHC:	virus de la hepatitis C

Introducción

1 El hígado

1.1 Estructura y función

El hígado es un órgano situado en el cuadrante superior derecho del abdomen, cuyo peso oscila entre 1.2 y 1.6 kg. Es un órgano muy irrigado que recibe por un lado, una gran cantidad de sangre de la vena porta, pobre en oxígeno pero rica en nutrientes y toxinas, y por otro, sangre oxigenada de la arteria hepática. La sangre de la vena porta proviene del tracto digestivo, el bazo y el páncreas; y circula por los sinusoides hepáticos permitiendo la absorción de nutrientes y otros compuestos, como fármacos, para su posterior metabolización, almacenamiento o eliminación. El hígado también tiene una importante función inmune debido a la llegada de microorganismos y productos de la microbiota del intestino. Además, el hígado funciona como glándula exocrina, produciendo bilis que es secretada a los conductos biliares; y endocrina, participando en la producción de hormonas. Por otro lado, produce la mayor parte de proteínas plasmáticas como albúmina o fibrinógeno entre otras, y sirve como almacenamiento de glucógeno, hierro y vitaminas (1).

A nivel histológico, la unidad funcional y estructural clásica del hígado es el lobulillo hepático, que consiste en una estructura hexagonal alrededor de la vena central formada por hepatocitos y capilares sinusoidales, y rodeada de tejido conectivo que forma el espacio portal. En este espacio encontramos la tríada portal compuesta por ramas de la vena porta y de la arteria hepática, el conducto biliar y también vasos linfáticos y nervios. Esta organización es indispensable para la función hepática ya que permite la circulación de la sangre a través de los sinusoides desde la vena porta hasta la vena central, donde se incorpora a la circulación sistémica por la vena hepática (Figura 1).

El parénquima está formado por los hepatocitos dispuestos radialmente y separados por los sinusoides formados por células endoteliales fenestradas, donde se encuentran las células de Kupffer, macrófagos residentes del hígado. De esta manera, en el espacio subendotelial se forma un área de intercambio entre la sangre y los hepatocitos llamado espacio de Disse donde se encuentran las células estrelladas hepáticas (CEH).

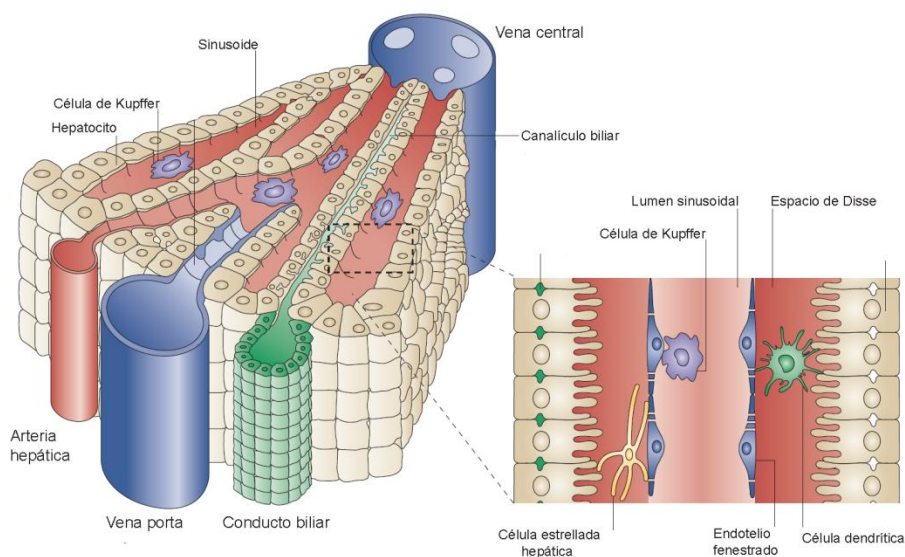


Figura 1: Estructura del lobulillo hepático.

El lobulillo hepático es la estructura funcional del hígado. La sangre procedente de la vena porta circula hacia la vena central a través de los capilares sinusoidales permitiendo el intercambio de moléculas con los hepatocitos. Entre los hepatocitos y las células endoteliales, encontramos el espacio de Disse donde residen las células estrelladas hepáticas (CEH). Figura modificada de Adams et al, 2006 (2).

1.2 Células hepáticas

Los hepatocitos representan aproximadamente un 80% del volumen del hígado mientras que las células no parenquimales, menos abundantes, incluyen múltiples tipos celulares como las células estrelladas, las células endoteliales, los colangiocitos, las células de Kupffer y otras células del sistema inmunitario como linfocitos o células dendríticas.

1.2.1 *Hepatocitos*

Los hepatocitos son células poliédricas de entre 25 y 30 μm con gran capacidad metabólica que realizan la mayoría de las funciones del hígado. Por un lado, participan en el metabolismo de la glucosa y su almacenamiento en forma de glucógeno y son responsables del mantenimiento de la glucemia normal mediante procesos de glucogenólisis y gluconeogénesis. Por otro lado, juegan un papel importante en metabolismo de lípidos y la síntesis de lipoproteínas y colesterol, y además pueden almacenar triglicéridos. Los hepatocitos también son capaces de degradar el grupo amonio resultante del metabolismo de aminoácidos, además de sintetizar gran parte de las proteínas plasmáticas y de los componentes de la bilis.

Los hepatocitos son células polarizadas que presentan receptores y transportadores especializados en cada polo. El polo sinusoidal tiene microvilis expuestos al espacio de Disse y se caracteriza por moléculas de intercambio entre el hepatocito y la sangre. En cambio, el polo canalicular en contacto con el canalículo biliar, que se forma entre dos hepatocitos, presenta una membrana más especializada en la excreción de bilis.

Asimismo, existe una heterogeneidad metabólica dentro del lobulillo debido al gradiente de oxígeno y nutrientes que se forma entre las ramas de la arteria hepática y la vena central. De esta manera, se conoce que en los hepatocitos periportales, más ricos en oxígeno y substratos, predominan los procesos gluconeogénicos mientras que en los perivenosos son más frecuentes los procesos glicolíticos.

1.2.2 *Células estrelladas*

Las células estrelladas hepáticas (CEH) son células mesenquimales que en condiciones normales, representan aproximadamente un 15% de las células totales del hígado. Situadas en el espacio de Disse, presentan prolongaciones que se extienden hacia los hepatocitos y las células sinusoidales, originando forma estrellada que ya fue descrita en 1876 por Karl Kupffer (3).

En condiciones no patológicas, la función más importante de las CEH es el almacenamiento de vitamina A (retinoides) en forma de gotas lipídicas en el citoplasma. Sin embargo, la función más relevante y más estudiada estos últimos años es su participación en procesos fibrogénicos. Dada su localización en el espacio de Disse, las CEH están en contacto con los otros tipos celulares del hígado facilitando la comunicación con las células vecinas mediante mediadores solubles y citoquinas. Muchos de estos estímulos paracrinos resultantes de daño hepático o inflamación, así como factores extrahepáticos, inducen la activación de estas células que se diferencian a miofibroblastos y adquieren funciones proliferativas, migratorias y contráctiles (Figura 2). Durante esta activación, se producen cambios fenotípicos como la pérdida gradual de los acúmulos de vitamina A y el aumento de la expresión de proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular (MEC). Además, también amplifican las señales inflamatorias secretando citoquinas y quimioquinas como MCP-1 o RANTES, y favoreciendo la infiltración de macrófagos, neutrófilos y otras células inmunes. En consecuencia, se produce un desajuste entre la síntesis y degradación de MEC que conduce al desarrollo de la fibrosis hepática (4).

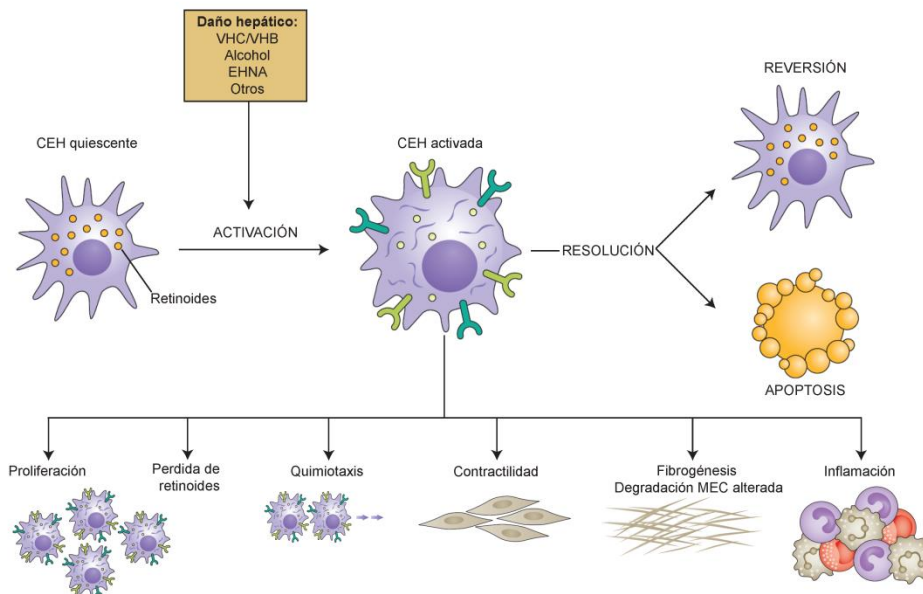


Figura 2: Activación de las células estrelladas hepáticas.

Las CEH quiescentes reciben estímulos de origen diverso estimulando su activación y su diferenciación. Las CEH activadas se caracterizan por la pérdida de las vesículas de retinoides, la proliferación, un aumento de la capacidad migratoria y la adquisición de funciones contráctiles. Además la expresión de colágeno y enzimas relacionados con la MEC (TIMP y MMP) así como de citoquinas y quimioquinas promueven los procesos fibrogénicos e inflamatorios. Figura modificada de Tsuchida; Friedman, 2017 (5).

1.2.3 Células de Kupffer

Las células de Kupffer son macrófagos del hígado que representan la población más grande de macrófagos residentes del ser humano. Estudios recientes sostienen que las células Kupffer se originan en el hígado fetal a partir de progenitores eritromieloides, descartando un origen hematopoyético (6); además mantienen capacidad para proliferar y mantener su población sin necesidad de infiltración de monocitos.

Situados en el lumen de los sinusoides, adheridos a las células endoteliales, son claves en la respuesta inmunitaria del hígado, y son más abundantes en regiones periportales que en regiones centrolobulares. Las células de Kupffer presentan prolongaciones citoplasmáticas que se extienden hacia el espacio de Disse aumentando su superficie y contacto con otros tipos celulares. En homeostasis, las células de Kupffer participan en el metabolismo del hierro, la bilirrubina así como lipoproteínas, y pueden fagocitar eritrocitos dañados o células apoptóticas. Asimismo, su principal función es eliminar de la circulación endotoxinas y patógenos procedentes de la vena porta reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos o daño (PAMPS o DAMPS, *pathogen or damage-associated molecular pattern molecules*). De esta manera pueden iniciar respuestas inflamatorias, produciendo citoquinas (IL-1, IL-6, TNF- α), radicales de oxígeno y otros mediadores inflamatorios, y reclutando otras células inmunitarias. Esta función tan importante para la defensa del organismo necesita un control meticuloso para evitar una inflamación excesiva que pueda implicar daño hepático. De hecho, se conoce el papel fundamental de las células de Kupffer en la patogénesis de múltiples enfermedades hepáticas o metabólicas, como el consumo de alcohol o la obesidad (7).

1.2.4 Células endoteliales sinusoidales

Las células endoteliales sinusoidales hepáticas (LSEC) representan aproximadamente el 20% de las células hepáticas y son células muy especializadas cuyas fenestraciones, de entre 50 y 150 nm, forman un capilar discontinuo muy permeable. Esta característica permite el intercambio de sustancias, como lipoproteínas,

proteínas del plasma o metabolitos, entre hepatocitos y la sangre a través del espacio de Disse. Al contrario que otras células endoteliales, las LSEC expresan receptores de membrana de tipo *scavenger*, así como receptores de manosa y de inmunoglobulinas; por lo que presentan capacidad endocítica para eliminar macromoléculas solubles y pequeñas partículas y tienen un papel clave en inmunidad (8).

Por lo tanto, los sinusoides son fundamentales para una correcta función hepática. En condiciones patogénicas, la disfunción del endotelio sinusoidal se traduce en la desaparición de las fenestraciones alterando el intercambio de sustancias entre la sangre y los hepatocitos.

1.3 Enfermedades hepáticas

A causa de su estructura y función, el hígado está continuamente expuesto a metabolitos, toxinas, virus y a antígenos derivados de los microorganismos del sistema digestivo, entre otros elementos nocivos. Cuando el hígado no es capaz de metabolizar o eliminar todos estos productos se dañan las células hepáticas pudiendo ocasionar procesos de muerte celular e inflamación.

En el caso de las enfermedades hepáticas agudas, los síntomas aparecen rápidamente y se resuelven en un periodo corto de tiempo, como por ejemplo el daño hepático inducido por fármacos como el paracetamol o algunas hepatitis víricas. Por el contrario, cuando la enfermedad dura más de seis meses se habla de enfermedad hepática crónica que se caracteriza por una lesión continuada que induce un proceso de destrucción y regeneración del parénquima hepático que conduce a fibrosis y cirrosis aumentando el riesgo de cáncer de hígado. Es el caso de la esteatohepatitis alcohólica y no alcohólica o de la hepatitis C.

2 Esteatohepatitis no alcohólica

La incidencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólica (EHGNA) está aumentando a nivel mundial alcanzando una prevalencia global de aproximadamente 25% (9) debido a su estrecha relación con la epidemia de obesidad y síndrome metabólico. Por ello, se está convirtiendo en la principal causa de enfermedad hepática en los países desarrollados.

Esta enfermedad se caracteriza principalmente por la acumulación de grasa en los hepatocitos e incluye desde una simple esteatosis, sin daño hepático, a la manifestación más compleja, la esteatohepatitis no alcohólica (EHNA). En esta última, la esteatosis viene acompañada de una excesiva deposición de matriz extracelular e inflamación que pueden progresar a cirrosis hepática aumentando el riesgo de cáncer hepático. A nivel histopatológico, la EHNA se define por la degeneración de los hepatocitos, denominada balonización hepatocitaria (*ballooning*, en inglés), que se identifica por un citoplasma más grande e hinchado, y por la aparición de cuerpos de *Mallory*, filamentos de citoqueratina en el citoplasma. Además, la infiltración inflamatoria es notoria y pueden observarse diferentes grados de fibrosis hepática.

2.1 Patogénesis de la EHNA: teoría del múltiple impacto

Aunque la enfermedad del hígado graso no alcohólica está asociada significativamente a la obesidad, la hipernutrición y un estilo de vida sedentario, la transición a EHNA de una parte de los enfermos (alrededor de 12%(10)) puede explicarse por muchos factores. Este concepto, denominado como la teoría del múltiple impacto, se ha desarrollado estos últimos años a partir distintos estudios y comprende factores hepáticos, extrahepáticos y genéticos que favorecerían los procesos inflamatorios y la lesión hepática (Figura 3).

2.1.1 Factores genéticos

En 2008, el primer estudio de asociación de genoma completo (GWAS) identificó una variante genética con mayor riesgo de enfermedad del hígado graso no alcohólica (11). Un alelo de *PNPLA3* (Patatin-like phospholipase domain-containing 3) resultó relacionarse con un alto contenido de grasa hepática e inflamación. Otros estudios confirmaron que este SNP, *PNPLA3* rs738409[G], que sustituye una isoleucina a metionina en la posición 148, está fuertemente asociado a la progresión de la enfermedad (12, 13) y también al desarrollo de cáncer hepático(14, 15).

Otro polimorfismo identificado mediante GWAS con gran asociación a la patogénesis y progreso de EHNA es *TM6SF2* (*Transmembrane 6 superfamily member 2*) rs58542926 (16), proteína implicada en la secreción de lipoproteínas. Esta variante se relaciona con un alto contenido de triglicéridos en hígado y bajo en circulación sanguínea resultando en un riesgo elevado de EHNA pero una menor probabilidad de enfermedades cardiovasculares (16, 17). Sin embargo, hasta el momento, no se ha establecido ninguna relación de este gen con el desarrollo de hepatocarcinoma en enfermos de EHNA.

Pese a que el papel biológico de las variantes está aún por esclarecer, éstas son interesantes para identificar y clasificar pacientes de hígado graso con más riesgo a progresar a EHNA y cáncer hepático y poder prevenir estas complicaciones.

2.1.2 Lípidos y lipotoxicidad

En el hígado, la ingesta excesiva de lípidos, además de acumularse en forma de triglicéridos, induce en los hepatocitos procesos de estrés celular, producción de ROS y muerte celular que favorecen la inducción de una respuesta inflamatoria. Esta lipotoxicidad junto a otros factores que también inducen daño en los hepatocitos están implicados en la progresión hacia EHNA.

Pese a ser una de las características de la enfermedad, la formación de gotas lipídicas y la síntesis de triglicéridos en los hepatocitos parece ser un mecanismo de protección para contrarrestar la toxicidad de ciertos lípidos y sus metabolitos (18). Por el contrario, está descrito que los ácidos grasos libres, sobre todo los saturados como el palmitato, aumentan la expresión de los componentes asociados a la respuesta a proteínas desplegadas (UPR) induciendo estrés del retículo endoplasmático y apoptosis a través de la fosforilación de JNK y la sobreexpresión de PUMA (19). Por otro lado, el incremento de la metabolización de estos ácidos grasos mediante la β -oxidación en la mitocondria genera una producción elevada de especies reactivas de oxígeno (ROS) (20). Con el tiempo, la producción sostenida de ROS desencadena alteraciones de la cadena respiratoria y la consecuente disminución de los niveles de ATP provocando una inestabilidad mitocondrial que pone en riesgo la viabilidad del hepatocito (21).

Respecto al colesterol, su acumulación en hígado se ha observado tanto en pacientes con EHNA como en modelos animales de la enfermedad (22) y también se ha visto implicado en la patogénesis de la enfermedad. En hepatocitos, el aumento del colesterol libre reduce los niveles de glutatión en la mitocondria sensibilizándolos a estímulos apoptóticos como TNF (23). Además el exceso de colesterol forma cristales en las células de Kupffer que inducen la activación del inflamasoma y contribuyen a la inflamación hepática (24).

2.1.3 Resistencia a insulina y tejido adiposo

Por lo general, la resistencia a insulina se manifiesta en muchos pacientes de EHNA y desencadena una serie de alteraciones en el metabolismo que contribuyen significativamente al desarrollo de la enfermedad. La insulina regula el metabolismo de glúcidos y lípidos en el hígado y en otros órganos como el tejido adiposo o muscular. La ausencia de señalización de esta hormona activa la lipólisis en el tejido adiposo aumentando los niveles de ácidos grasos libres que se acumularán en el hígado en forma de triglicéridos e inducirán lipotoxicidad. Además,

la resistencia a insulina en los hepatocitos induce la gluconeogénesis e inhibe la formación de glucógeno, aumentando los niveles de glucosa que será redirigida a vías lipogénicas (25) incrementando el daño celular. Por ello, una mayor resistencia a insulina correlaciona con una progresión más agresiva de la enfermedad hepática (26).

Por otro lado, las alteraciones metabólicas conllevan una disfunción del tejido adiposo. Esto se caracteriza por la infiltración de células inflamatorias, como macrófagos, en respuesta a la muerte de adipocitos en el tejido adiposo visceral (27) y por la secreción de citoquinas proinflamatorias como TNF- α o IL-6 (28). En pacientes obesos, se ha descrito una relación entre la presencia de macrófagos en el tejido adiposo visceral y la progresión de la fibrosis (27) por lo que la inflamación del tejido adiposo promueve a nivel hepático procesos inflamatorios y fibrogénicos.

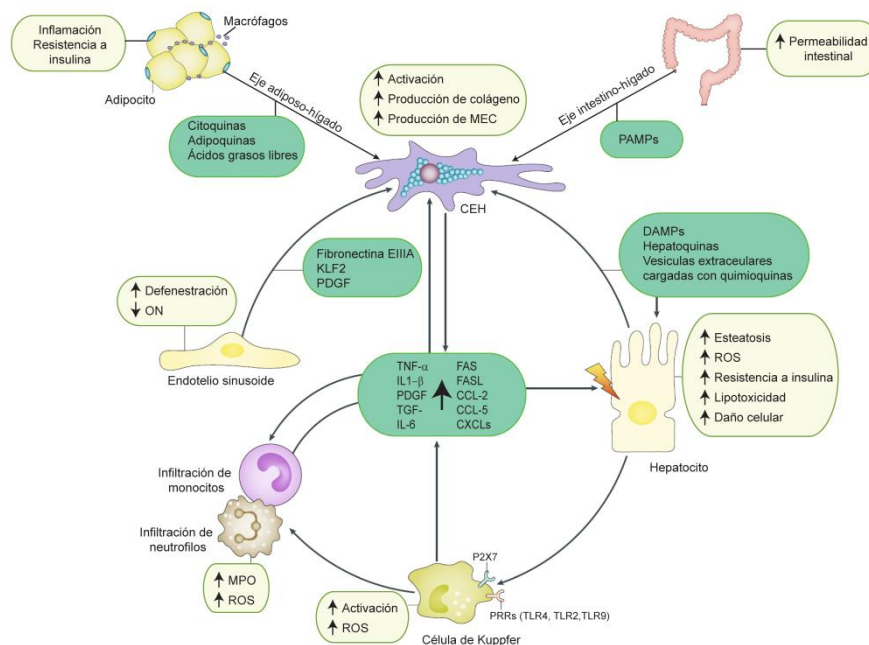


Figura 3: Interacción entre las células hepáticas en EHNA.

Las CEH reciben múltiples señales de las células hepáticas y así como tejidos extrahepáticos (intestino y el tejido adiposo). Citoquinas, DAMPs, PAMPs y otras moléculas inducen la activación de las CEH iniciando el proceso fibrogénico. Figura adaptada de Schuster et al., 2018 (29)

2.1.4 Eje intestino-hígado

Durante la última década, el papel de la microbiota intestinal en procesos inflamatorios ha aportado nuevas vías de señalización importantes en distintas enfermedades (30). En obesidad y enfermedades hepáticas, la disbiosis intestinal, es decir el cambio en las poblaciones de microorganismos, ha sido descrita y caracterizada en humanos y en modelos animales (31-33), estableciendo una conexión entre el hígado y el intestino.

Uno de los efectos de la disbiosis, es la pérdida de integridad intestinal que permite la translocación de bacterias o algunas de sus proteínas induciendo inflamación, sobre todo en el tejido hepático, por lo que los niveles de endotoxina en sangre son mayores en pacientes con EHNA que en individuos controles (34). Endotoxinas y otros productos microbianos activan rutas inflamatorias, mediante TLR4 y otros receptores, en las células inflamatorias del hígado aumentando la inflamación e induciendo la deposición de matriz extracelular. De hecho, la ausencia de TLR4 en modelos murinos de EHNA disminuye el daño hepático y la inflamación (35).

Asimismo, los ácidos biliares, sintetizados en el hígado como componente principal de la bilis y secretados al intestino para la absorción de grasas, juegan un papel importante en la comunicación entre el hígado y el sistema gastrointestinal participando en la patogénesis del EHNA (36). Tanto en pacientes con EHNA como en modelos animales se han observado alteraciones en la composición y los niveles de ácidos biliares en hígado (37, 38) que podría estar relacionado con la disbiosis intestinal (39). Estos cambios pueden modificar el metabolismo de glucosa y lípidos a través de los receptores nucleares FXR y los receptores TGR5 y además pueden estar implicados en la inducción de la inflamación y fibrosis. Por otro lado, estos receptores en los enterocitos estimulan la producción del factor de crecimiento de fibroblasto FGF19 (FGF15 en ratones) que en los hepatocitos se une a su receptor FGFR4 regulando negativamente la síntesis de más ácidos biliares. Al analizar los niveles de FGF19 se ha observado una menor producción en el intestino en pacientes con EHNA y una menor respuesta hepática a éste en los pacientes con resistencia a insulina (40), destacando la importancia de la señalización de los ácidos biliares en la patogénesis de la enfermedad y su posible modulación con fines terapéuticos.

2.2 Progresión y regresión de la fibrosis hepática

La inflamación y el desarrollo de fibrosis es el punto de inflexión en la progresión de la enfermedad. De hecho, la mortalidad relacionada con la enfermedad hepática aumenta exponencialmente con la aparición y desarrollo de fibrosis (41, 42). La fibrosis se caracteriza por un desequilibrio entre la producción y la degradación de matriz extracelular que favorece el depósito de colágeno y disminuye la flexibilidad del hígado. En este proceso las CEH y su activación juegan un papel crucial.

2.2.1 Progresión de la fibrosis hepática

Diversas señales inician el proceso de activación y la diferenciación a miofibroblastos de las CEH mientras que otros impulsos se encargan de perpetuar este fenotipo (43). A continuación se detalla los mecanismos moleculares y biológicos que ocurren durante esta activación.

A nivel molecular, diversos factores de crecimiento secretados de manera autocrina y paracrina estimulan vías de señalización de supervivencia y proliferación en las CEH. El más estudiado es TGF- β que mediante factores de transcripción como SMAD3 es capaz de aumentar potentemente la expresión de genes fibrogénicos como el colágeno de tipo I y III (44, 45). PDGF es otro factor de crecimiento esencial para la proliferación y la migración de las CEH que aumentan rápidamente su expresión y la de su receptor PDGFR β al activarse (46, 47). También se ha observado en hígados fibróticos humanos un aumento de los niveles de CTGF; este factor cuya expresión es inducida por TGF- β , promueve la producción de matriz extracelular así como la migración, la proliferación y la supervivencia celular (48). Finalmente, el factor angiogénico VEGF, secretado principalmente por las células endoteliales, tiene un papel dual para las CEH ya que es capaz de activar sus propiedades fibrogénicas pero a la vez resulta imprescindible para la regeneración hepática y la resolución de la fibrosis.

La localización de las CEH en el espacio de Disse permite la interacción con células vecinas que en caso de daño hepático estimulan la activación de las CEH. Durante el desarrollo de EHNA, los hepatocitos están sometidos a cambios metabólicos y a un estrés celular que provoca cambios en el fenotipo de las CEH. Se ha demostrado que el aumento de la producción de ROS por parte de los hepatocitos estimula la respuesta fibrogénica y la migración de las células estrelladas (49). Esta activación también puede ser inducida por la muerte de los hepatocitos, ya sea por la fagocitosis de cuerpos apoptóticos (50, 51) o por liberación de DAMPS y su señalización a través de los receptores TLR y NLR presentes en las CEH (52). Asimismo, estos receptores también pueden detectar la presencia de endotoxinas o productos microbianos procedentes del intestino

deteriorado y más permeable durante el EHNA. En el caso de TLR4, su activación en CEH induce la producción de citoquinas inflamatorias y favorece la señalización profibrogénica de TGF- β (53). Por otro lado, el daño hepático implica la respuesta de las células de Kupffer y el reclutamiento de monocitos inflamatorios que secretan una serie de citoquinas y quimiocinas como MCP1, CCL5, o TGF- β , favoreciendo la activación así como la migración de las CEH. Algunas de estas citoquinas mediante la activación de la vía NF- κ B promueven además la supervivencia de las CEH activadas (54).

La degradación inicial de matriz extracelular provoca un cambio en la composición de la matriz e induce la producción de fibras de colágeno tipo I y III que acaban predominando en hígados fibróticos. Estas alteraciones contribuyen a la activación de las CEH mediante cambios en la señal de integrinas y otras proteínas. La deficiencia de integrinas en CEH protege frente a la de fibrosis inducida por CCl₄ evidenciando su función fibrogénica a través del control de la actividad de TGF- β (55). En esta remodelación de la matriz participan las metaloproteinasas, una familia de proteínas dependientes de calcio que degradan colágeno y otros sustratos (56). La expresión de estas metaloproteinasas aumenta en fibrosis y las CEH expresan muchas de ellas como MMP-2, MMP-9 o MMP-13 aunque también expresan inhibidores de metaloproteinasas (TIMP) reduciendo la degradación y provocando la acumulación de matriz extracelular (57).

Una de las características del hígado graso es el aumento de los niveles de colesterol libre y de ácidos grasos que también participan en la diferenciación a miofibroblastos de las CEH. La acumulación de colesterol en CEH reduce la expresión de BAMBI, un regulador negativo de TGF- β , sensibilizando estas células a la señalización profibrogénica de este factor (58).

2.2.2 Resolución de la fibrosis hepática

La regresión de la fibrosis en humanos se ha observado tras el tratamiento de la causa primaria de la enfermedad crónica. La aparición de antivirales ha permitido la reversión de la fibrosis en pacientes de hepatitis B (59) mientras que en el caso del EHNA, un cambio en el estilo de vida y pérdida de peso reduce la progresión y severidad de la fibrosis (60). Con la intención de mejorar el tratamiento, las CEH han sido objeto de estudio identificando tres formas de reducir su activación: apoptosis, senescencia y reversión (Figura 2).

Las CEH activadas expresan una variedad de receptores inductores de muerte celular como TRAIL o FAS que al estimularse inician la apoptosis reduciendo el número de células activadas (61). No obstante, como se ha comentado anteriormente, estas células reciben muchas señales de supervivencia que pueden contrarrestar la acción de estos receptores.

Por otro lado, la inducción de la senescencia permite inhibir la proliferación de las CEH y altera la expresión génica reduciendo la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y favoreciendo la respuesta inmunitaria para la resolución de la fibrosis (62).

Finalmente, en modelos animales de fibrosis, se ha descrito una desactivación de las CEH que revierten su fenotipo activado, disminuyendo la expresión de genes profibrogénicos. Estas células recuperan un estado muy parecido a la quiescencia aunque son más susceptibles a futuros estímulos (63, 64).

2.3 Diagnóstico y tratamientos del EHNA

La enfermedad del hígado graso no alcohólica es asintomática en la gran mayoría de los pacientes y su diagnóstico suele resultar de anomalías en los niveles de enzimas hepáticas en suero. La esteatosis en hígado puede confirmarse fácilmente mediante métodos de imagen ya sea por ultrasonidos o resonancia magnética.

Para el correcto diagnóstico de EHGNA es necesario descartar otras causas de esteatosis como el consumo excesivo de alcohol (superior a 20 gramos por día en mujeres y 30 en hombres), infecciones víricas, intoxicaciones o enfermedades autoinmunes (65).

Por el contrario, en el caso de la EHNA, el diagnóstico es más complejo. La biopsia hepática y el análisis histológico es el único método para diagnosticar y estratificar la enfermedad. El diagnóstico se basa en la observación de las características de la EHNA, esteatosis, inflamación lobular o portal y balonización en los hepatocitos, así como el grado de fibrosis. Para clasificar a los pacientes según la severidad se han creado sistemas de puntuaciones (como el NAS) que se basan en estas características histológicas presentes en la biopsia (66) (Tabla 1). Dado el alto porcentaje de población con riesgo de EHNA y la variabilidad en biopsias, este método se considera poco eficaz para el diagnóstico, así como para la evaluación del progreso de la enfermedad durante ensayos clínicos.

Puntuación		
ESTEATOSIS	0	<5% (mínima)
	1	5-33% (leve)
	2	34-66% (moderada)
	3	>66% (severa)
INFLAMACIÓN LOBULAR	0	No hay focos inflamatorios
	1	<2 focos inflamatorios
	2	2-4 focos inflamatorios
	3	> 4 focos inflamatorios
BALONIZACIÓN	0	Ninguno
	1	Escasas células balonizadas
	2	Prominentes balonización
NAS score = (0-8)		
FIBROSIS	0	Sin fibrosis
	1	Fibrosis perisinual o portal/peripoportal
	2	Fibrosis perisinual y portal/peripoportal
	3	Hay puentes de fibrosis
	4	Cirrosis
NASH CRN fibrosis = (0-4)		

Tabla 1: Sistema de puntuación NAS para la estratificación de pacientes.

NAS (*NAFLD Activity Score*) es un sistema de puntuación diseñado por el comité de patología del NASH CNR (*NASH Clinical Research Network*). La evaluación semicuantitativa de 4 características histológicas permite el diagnóstico de la EHNA con una puntuación igual o mayor de 5 y la evaluación del progreso de pacientes.

La severidad de la fibrosis es un factor que incrementa el riesgo de muerte, por ello el desarrollo de métodos para detectarla de manera no invasiva ha sido uno de los objetivos en la investigación biomédica en los últimos años. La elastografía es una técnica de imagen que se utiliza para determinar la rigidez del hígado. A partir de la velocidad de propagación de ondas vibratorias se puede calcular la rigidez en kilopascales (kPa) que permite establecer el grado de fibrosis. Pese a representar un gran avance, presenta una gran desventaja al no detectar correctamente estadios tempranos de fibrosis. Esto mismo ocurre en los algoritmos desarrollados para predecir la fibrosis a partir de marcadores séricos como el índice FIB-4 (67) basado en la edad, los niveles de transaminasas y el recuento de plaquetas.

Respecto al tratamiento, en la actualidad no existe ninguno específico para el EHNA. Para el manejo de la enfermedad, además del tratamiento de comorbilidades como la resistencia a insulina, se recomienda un cambio de hábitos alimentarios y un aumento del ejercicio físico ya que una pérdida de peso de al menos un 7% induce mejoras a nivel histológico de la EHNA (68). Pero en muchas ocasiones, este cambio en el estilo de vida es difícil de lograr o de mantener por lo que se necesitan nuevas estrategias terapéuticas.

El desarrollo de nuevos fármacos se ha centrado en dianas relacionadas con la patogenia para reducir la inflamación, la lipotoxicidad y revertir la fibrosis y muchos de ellos ya han sido probados en ensayo clínico con resultados alentadores. Agonistas de FXR (*Farnesoid X receptor*) como el ácido obeticólico, que se encuentra en fase III, se han probado con la intención de restablecer la señalización de los ácidos biliares obteniendo mejoras en el grado de esteatosis, inflamación y fibrosis (69). Por otro lado, la ingesta de probióticos para reemplazar la microbiota intestinal asociada a EHNA ha mostrado buenos resultados en ensayos con pacientes (70). Finalmente, uno de los últimos fármacos probados en ensayos clínicos con finalidad antifibrótica es el Cenicriviroc, un inhibidor de los receptores CCR2 y CCR5, responsables de la migración de monocitos y de las CEH, que ha mostrado una reducción de la fibrosis en pacientes con EHNA tras un año de tratamiento.

2.4 Modelos animales en el estudio del EHNA

El aumento en la incidencia de la EHNA durante estos últimos años ha disparado el número de estudios epidemiológicos, clínicos y preclínicos relacionados con la enfermedad. En la actualidad, a nivel preclínico la falta de un modelo animal adecuado es el principal inconveniente para el estudio del desarrollo de la EHNA. Es muy difícil generar un modelo animal que presente las numerosas manifestaciones de esta enfermedad, que abarca desde la desregulación metabólica a la inflamación hepática, y por ello, existe una gran controversia a la hora de escoger el modelo animal en ensayos preclínicos, especialmente para la validación de nuevos fármacos.

Los modelos genéticos de obesidad y síndrome metabólico como el ratón deficiente en leptina (*ob/ob*) no desarrollan EHNA de manera natural y además suelen ser resistentes al desarrollo de fibrosis incluso a la inducida por hepatotoxinas (71). Por ello, pese a la diferencia en el desarrollo de EHNA entre cepas y sexos (72, 73), los modelos más frecuentes son los dietéticos que se resumen a continuación.

En la dieta rica en grasas (*high fat*), el aporte calórico de las grasas es entre un 60 y un 70 % (74) y puede ir acompañado de un mayor porcentaje de colesterol (entre 0.1 y 2%, *high fat high cholesterol*), para favorecer la dislipidemia (75). Estas dietas que se administran durante periodos largos (más de 20 semanas), generan obesidad, esteatosis, dislipidemia y una leve inflamación hepática; sin embargo, su principal inconveniente es que no desarrollan fibrosis. En las llamadas *Western diets*, se complementa estas dietas con niveles altos de sucrosa o fructosa para amplificar el daño hepático; no obstante, aunque se aprecia una mayor resistencia a insulina e inflamación, la fibrosis es leve por lo que no se considera un modelo óptimo (76). La *western diet* parece ser más agresiva en la cepa DIAMOND, un cruce entre las cepas C57BL/6J (B6) y 129S1/SvImJ, que desarrolla mayor grado de fibrosis (77).

Otro modelo clásico de EHNA más rápido es la dieta deficiente en colina y metionina (MCD). La colina es necesaria para la síntesis de *nov* de fosfatidilcolina así como para el transporte de triglicéridos mediante lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), mientras que la metionina es un aminoácido esencial para la síntesis de proteínas y otras moléculas. La deficiencia de colina y metionina produce en unas 6 semanas una acumulación de grasas en los hepatocitos acompañado de un aumento de ROS, infiltración de células inflamatorias y fibrosis moderada (78). La principal desventaja de este modelo es la pérdida de peso debido a un aumento del metabolismo y la falta de las manifestaciones metabólicas de la EHNA, como la resistencia a insulina (79, 80).

Diferentes variantes de la dieta MCD se han usado para evitar la excesiva pérdida de peso. La dieta deficiente únicamente en colina (CD), pese a desarrollar menos inflamación y daño hepático, induce en ratas, resistencia a insulina y un aumento de los niveles de triglicéridos en plasma y no altera el peso de los animales (81). Así pues, la dieta CDAA (*choline-deficient, L-aminoacid-defined*) con un porcentaje muy bajo de metionina (82) o la dieta

CD suplementada con etionina (83), un agonista de la metionina, reproducen notablemente las manifestaciones hepáticas de EHNA en unas 10 semanas.

Estos últimos años, muchos grupos han intentado mejorar estos modelos proponiendo nuevas dietas o combinando diferentes estímulos para obtener en un tiempo relativamente corto un modelo de NASH con fibrosis que progrese hacia cirrosis y cáncer hepático. Es el caso de la dieta rica en grasas, deficiente en colina y restringida en metionina (0.1%), descrita en 2013, que induce, en tan sólo 6 semanas, una clara esteatosis, inflamación y una fibrosis considerable y que hasta el momento parece la mejor opción para estudios de fibrosis en EHNA (84). Además esta dieta permite la progresión de la enfermedad a hepatocarcinoma en 36 semanas (85). Otro ejemplo más reciente, es la combinación de la *Western diet* con inyecciones de tetracloruro de carbono que induce una fibrosis severa a las 12 semanas y hepatocarcinoma a las 24 (86).

3 Los receptores TAM y sus ligandos

La familia de receptores TAM se compone de tres proteínas tirosina quinasa, TYRO3, AXL y MERTK. Descubiertas por distintos grupos, fueron agrupadas como subgrupo de las proteínas tirosina quinasa por sus características comunes en 1991 (87). Se consideraron receptores huérfanos hasta 1995 cuando se identificó los dos ligandos de esta familia: GAS6 y proteína S (PROS) (88, 89). Estas proteínas son evolutivamente tardías ya que no se encuentran en *Drosophila* o *C.elegans* y aparecen en el genoma de prevertebrados como *Ciona* al mismo tiempo que surgen los receptores de citoquinas (90). Desde su identificación hasta la actualidad se les han asignado numerosas funciones incluyendo la supervivencia celular y la regulación de la inflamación.

3.1 Estructura de los receptores TAM y sus ligandos

Los receptores TAM son proteínas transmembrana de la familia tirosina quinasa con una estructura muy similar (Figura 4). La región extracelular está formada por dos dominios de tipo inmunoglobulina, responsables de la unión al ligando, y repeticiones de fibronectina tipo III en tándem, mientras que en la región citoplasmática del receptor está el dominio catalítico tirosina quinasa (91). Respecto a la distribución de estos receptores, AXL está presente en casi todas las células del organismo ya sean de origen epitelial, mesenquimal o hematopoyético (92), mientras que MERTK y TYRO3 tienen una expresión más restringida. MERTK se encuentra principalmente en ovarios, testículos, próstata, pulmón y en menor medida en hígado, bazo, colon e intestino delgado (93). Por su parte, TYRO3 es expresado en el sistema nervioso central, riñón, ovarios y testículos (94, 95). Hay que destacar ciertos tipos celulares por la abundante expresión y actividad de estos receptores como son las células del sistema inmunitario (macrófagos, monocitos, células dendríticas y *natural killers*), plaquetas, osteoclastos, células de Sertoli, células del epitelio pigmentario de la retina y células endoteliales (96).

En cuanto a los ligandos, GAS6 y PROS comparten aproximadamente un 42% de la secuencia de aminoácidos. Estas proteínas tienen una estructura muy característica compuesta por un dominio SHBG (*sex hormone-binding globulin*) en el extremo C-terminal, cuatro dominios de tipo EGF y un dominio Gla amino-terminal (Figura 4). La región SHBG se une a los dominios de inmunoglobulinas de los receptores desencadenando su dimerización y su activación. Por el contrario, el dominio Gla, que es muy común en proteínas de la cascada de coagulación, contiene alrededor de 60 aminoácidos y presenta numerosos residuos de glutamato γ -carboxilados mediante reacciones dependiente de vitamina K. Estos residuos γ -carboxiglutamatos son capaces de unirse a la fosfatidilserina por lo que tanto GAS6 como PROS se encuentran unidas a células que han expuesto la fosfatidilserina a la membrana externa, es decir células apoptóticas o plaquetas activadas (97). Como la mayoría de proteínas dependientes de vitamina K, PROS se expresa principalmente en el hígado pero también en el riñón, pulmones y gónadas. En cambio, en condiciones normales, apenas se secreta GAS6 en el hígado

mientras que es abundante en células endoteliales, plaquetas, médula ósea, riñón, pulmones y corazón (98). Estas proteínas se detectan en la circulación sanguínea, en grandes cantidades en el caso de PROS (alrededor de 300nM) (99) y en menor medida GAS6 (≤ 0.2 nM) (100). Son tan altas las concentraciones de PROS que sus receptores MERTK y TYRO3 están constantemente saturados en las células sanguíneas que los expresan.

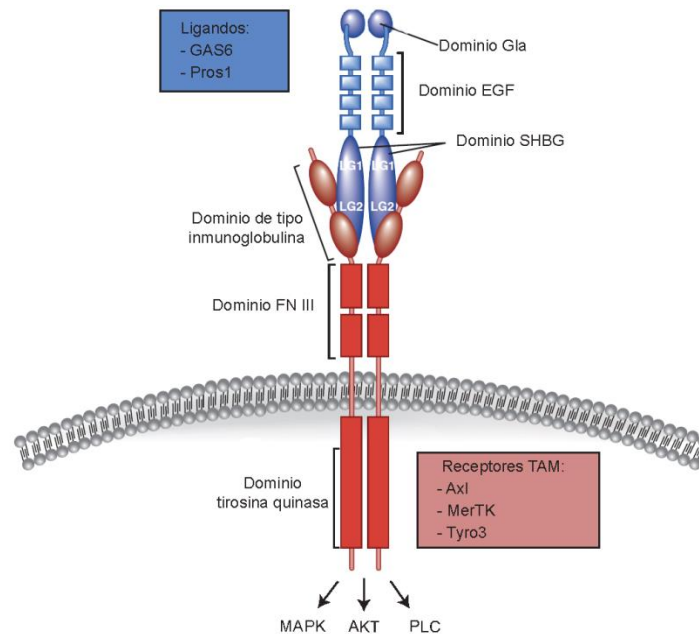


Figura 4: Estructura de los receptores TAM y sus ligandos.

Los dominios SHBG de los ligandos interactúan con los dominios de tipo inmunoglobulina de los receptores TAM induciendo la actividad tirosina quinasa de la región intracelular. Figura adaptada de Lemke et al., 2013 (91).

3.2 Activación de los receptores TAM

La afinidad de los ligandos no es idéntica para todos los receptores. GAS6 se une con más afinidad a AXL (101) que a los otros receptores, mientras que PROS tiene preferencia por TYRO3 y MERTK (102). La unión del ligando induce la dimerización de los receptores y la actividad tirosina quinasa que autofosforila tirosinas cercanas al terminal carboxilo, conservado en los tres receptores. Esta autofosforilación permite el reclutamiento de diversas moléculas adaptadoras con dominios de unión a fosfotirosinas (como GRB2) y aumenta la actividad catalítica del receptor que fosforila estos adaptadores. Se forma entonces un complejo de señalización multiproteico que induce diversas vías de señalización como la vía PI3K/AKT, la vía de las MAPK o la fosfolipasa C (103, 104).

Además de la descrita anteriormente, se han observado otros tipos de activación de los receptores TAM. AXL y TYRO3 son capaces de formar dímeros y activarse de manera independiente de ligando cuando son sobreexpresados (105, 106). En el caso de AXL, esta unión homofílica puede producirse entre receptores de células diferentes produciendo agregación celular (107). AXL también puede interactuar con el receptor de interferón (INFAR) o el receptor de VEGF-A y modificar su señalización. Finalmente, es muy probable una activación mediante la formación de heterodímeros entre los receptores TAM. De hecho, AXL y TYRO3 co-inmunoprecipitan en células neuronales (108) y se ha descrito en macrófagos que la presencia de AXL y TYRO3 es esencial para que MERTK ejerza su función fagocitaria correctamente (109). Estos resultados demuestran la formación de heterodímeros aunque son necesarios más estudios para entender estas interacciones y en que células se producen.

AXL y MERTK son escindidos por metaloproteinasas permitiendo la liberación de la parte extracelular que puede alcanzar circulación sanguínea (110, 111). Hasta ahora se han descrito ADAM10 y ADAM17 (TACE) como responsables de esta escisión (111, 112) y la detección en suero de las fracciones extracelulares está aumentada en ciertas condiciones patogénicas (113). Estos ectodominios son capaces de unirse a GAS6 circulante disminuyendo su disponibilidad y actividad (114). Por lo tanto, casi todas las moléculas GAS6, cuyos niveles en sangre son realmente bajos, están asociadas a los dominios solubles de MERTK y sobre todo de AXL (115).

3.3 Funciones de los receptores TAM

La generación de ratones deficientes en los receptores TAM ha permitido describir numerosos procesos biológicos relacionados con su señalización (116). A simple vista, el ratón deficiente en los tres receptores TAM es viable y aparentemente normal, por lo que estos receptores no serían esenciales durante la embriogénesis. Sin embargo, con el tiempo desarrolla esplenomegalia y un aumento de linfocitos y otras células inmunitarias. De hecho, estas células se encuentran activadas de manera constitutiva reproduciendo manifestaciones de enfermedades autoinmunes como autoanticuerpos, hemorragias, lesiones cutáneas entre otras (117). Además, este ratón experimenta procesos de degeneración como un incremento en la muerte de las células germinales en los testículos a las tres semanas de vida o la pérdida de todos los fotoreceptores de la retina a los tres meses (116). Este fenotipo resume las principales funciones de los receptores TAM que incluyen la regulación del sistema inmunitario y la fagocitosis de células apoptóticas.

3.3.1 Control de la inflamación

El sistema inmunitario necesita una regulación estricta para evitar una activación excesiva y el desarrollo de inflamación crónica. La autoinmunidad desarrollada en ratones deficientes en TAM junto a la mayor susceptibilidad al shock endotóxico en ratones deficientes en MERTK (118) demuestran un rol importante de estos receptores en la respuesta innata.

Tanto macrófagos como células dendríticas expresan los tres tipos de receptores TAM que son necesarios para una respuesta correcta frente a bacterias o agentes externos. Células dendríticas deficientes en AXL, MERTK o ambos muestran una mayor secreción *in vitro* de citoquinas inflamatorias como IL-6 y TNF- α tras la activación de TLR. En cambio, la estimulación de estos receptores con GAS6 reduce la secreción de estas citoquinas (119). En esta regulación negativa, los receptores TAM modulan mediante SOCS1 y SOCS3 la señalización de los TLR inhibiendo la vía NF- κ B y MAPK. En el estudio de Rothlin, se describe en células dendríticas como los TLR inducen, a través del factor de transcripción STAT1, la expresión de citoquinas y de AXL que en presencia de ligando, interacciona directamente con el receptor de interferón para redirigir la señal hacia vías antiinflamatorias (119).

Las células presentadoras de antígeno presentan una expresión diferencial de los receptores TAM. AXL predomina en las células dendríticas, mientras que MERTK es más abundante en macrófagos (120). No obstante ambos tipos celulares son capaces de secretar GAS6 y PROS amplificando la actividad de los TAM de manera autocrina. Asimismo, la expresión de AXL, pero no la de MERTK, aumenta en respuesta a estímulos inflamatorios como la activación de los TLR, lo que sugiere diferencias en las funciones de los receptores.

3.3.2 Regulación de la eferocitosis

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina se expone al espacio extracelular dónde es reconocida por células fagocitarias para la eliminación de células muertas y cuerpos apoptóticos. En este proceso de fagocitosis, que se conoce como eferocitosis, participan los receptores TAM. El dominio Gla de GAS6 y PROS se acopla a las

fosfatidilserinas de las membranas mediante uniones dependientes de Ca^{2+} . Los receptores TAM reconocen estos ligandos facilitando el acercamiento a la célula apoptótica y su fagocitosis.

Tanto en la retina como en el sistema reproductor es necesaria la muerte programada de sus células para un correcto mantenimiento del tejido (121, 122). Por un lado, las células de Sertoli, que expresan los tres receptores TAM, son las responsables de fagocitar restos celulares que se crean durante la maduración del esperma (123). Por otro lado, MERTK y TYRO3 se expresan en las células del epitelio pigmentario de la retina que fagocitan las membranas distales de los fotorreceptores para su mantenimiento (102). La ausencia de TAM impide eliminar cuerpos apoptóticos y debris celular que se acumulan y resultan tóxicos para las células germinales y los fotorreceptores, convirtiendo a los ratones deficientes en TAM en estériles y ciegos a los pocos meses de vida.

Este rol en la eferocitosis también es importante en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En un organismo adulto ya sea por homeostasis o por la respuesta inmunitaria frente a bacterias o virus, se produce la muerte de muchas células que deben ser eliminadas por macrófagos. Un defecto en esta eliminación por una función ineficiente de los TAM produce un aumento de DAMPs y autoantígenos que contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes, como ocurre en el ratón deficiente en TAM y en enfermedades autoinmunes humanas como el lupus eritematoso (124).

Estas células apoptóticas ejercen además un estímulo inmunomodulador (125). Su fagocitosis induce en las células presentadoras de antígeno la secreción autocrina de los ligandos de TAM, activando su señalización antiinflamatorias a través de su actividad tirosina quinasa (126).

La mayoría de estudios sobre TAM y fagocitosis se centran en el papel de MERTK pero los tres receptores contribuyen a esta función en distintos tipos celulares (127). Pese a que los receptores TAM son necesarios para la eferocitosis, su deficiencia no altera a la actividad fagocitaria general pudiendo fagocitar moléculas bacterianas o esferas de látex (128). Recientemente, se han identificado nuevos ligandos de MERTK relacionados con señales de fagocitosis como TUBBY, TULP1 y Galectina-3 (129, 130).

3.3.3 Otras funciones de los TAM y sus ligandos.

3.3.3.1 Trombosis y coagulación.

La protección frente a la trombosis en animales carentes de GAS6 fue la primera evidencia de la función de este eje en la función plaquetaria (131). Las plaquetas requieren los tres receptores TAM para una correcta agregación plaquetaria y coagulación. La señalización de los receptores TAM estimula la secreción de gránulos y la fosforilación de integrina $\beta 3$ induciendo la activación y agregación plaquetaria (132). Además, GAS6 aumenta la expresión de factor tisular en caso de daño vascular. Por otro lado, la proteína S sin necesidad de unirse a TAM actúa como cofactor de la proteína C e inhibe diversos factores de coagulación (133).

3.3.3.2 Diferenciación de las células NK.

Las células NK participan en la inmunidad innata y tienen una gran actividad citotóxica mediante la exocitosis de perforinas y granzinas. Estas células expresan una serie de receptores activadores (L749, CD94) o inhibidores (CD69, DX5) que controlan el reconocimiento de ligandos y su activación. Las células NK de animales deficientes en TAM no son capaces de secretar sus gránulos debido a la falta de receptores funcionales. Las células NK expresan los tres receptores TAM y su señalización es necesaria para su maduración: las células estromales de la médula ósea secretan GAS6 y PROS para estimular las células NK inmaduras e inducir la expresión de su repertorio de receptores (134).

3.3.3.3 TAM en cáncer.

Los receptores TAM se encuentran sobreexpresados en numerosos tipos de cáncer. Se ha observado su elevada expresión en leucemias (93, 135, 136), gliomas (137, 138), cáncer colorrectal (139), cáncer de mama (140, 141), melanoma (142, 143), adenoma pancreático (144, 145), cáncer de próstata (146) y hepatocarcinoma (147). En muchos de ellos la expresión de AXL se ha relacionado con el crecimiento tumoral y la metástasis y ha correlacionado con un mal pronóstico o con la resistencia a fármacos. Durante estos últimos años, el papel de estos receptores ha sido muy estudiado en procesos oncogénicos así como a nivel de terapia. A continuación se describe las funciones celulares prooncogénicas en las que participa la activación de TAM.

Estos receptores son capaces de estimular vías tanto de supervivencia como de proliferación celular y de evasión de la apoptosis (148, 149). Tras la unión de GAS6, proteínas adaptadoras, como GRB2, se unen a los receptores fosforilados y, a través de RAS, inducen la vía de las MAPK que promueve la supervivencia y la proliferación celular (150). Por otro lado, se ha descrito que la estimulación de AXL vía la activación de PI3K-AKT induce un aumento de la expresión de la proteína antiapoptótica BCL2 y una disminución de la proapoptótica BAD (151). De esta manera los receptores TAM participan en los procesos oncogénicos promoviendo la supervivencia de las células cancerígenas y favoreciendo el crecimiento tumoral.

Por otro lado, la regulación y modificación del citoesqueleto de actina resultado de la activación de los TAM, clave para la fagocitosis y la agregación plaquetaria, podría producir cambios en la morfología celular que favorecieran la invasión y migración de células tumorales (152, 153). Otro hecho por el que se ha vinculado a los receptores TAM con la metástasis es la capacidad de AXL de inducir la transición epitelio-mesénquima. La activación de ERK y JNK promueve la expresión de SLUG, un factor de transcripción represor de la caderina E, y aumenta la movilidad celular (154). Por ejemplo, en glioblastomas, la expresión de AXL mutado sin dominio quinasa *in vitro* disminuye la movilidad celular y reduce las interacciones entre células mientras que *in vivo* inhibe el crecimiento y la invasión tumoral (155).

La expresión de GAS6 por parte de las células del músculo liso vascular podría favorecer la angiogénesis tumoral. La estimulación de AXL en estas células promueve su proliferación y migración (156, 157). Por otro lado, en experimentos con la línea endotelial HUVEC, la sobreexpresión de AXL incrementa su crecimiento y la formación de tubos. Esta función angiogénica de AXL se ha confirmado en modelos *in vivo* donde se observa una menor formación de vasos sanguíneos al reducir la expresión del receptor (158). Aunque el papel de TYRO3 y MERTK en el proceso angiogénico no ha sido demostrado, AXL jugaría un papel esencial en la neovascularización favoreciendo el crecimiento tumoral.

Finalmente, el microambiente tumoral influye considerablemente en el desarrollo del tumor. Tanto células NK como células de la respuesta inmunitaria innata, en presencia de GAS6, expresan un perfil menos citotóxico y menos inflamatorio lo que podría contribuir al crecimiento tumoral (159, 160).

3.4 GAS6 y receptores TAM en hígado

El modelo animal deficiente en los tres receptores TAM también manifiesta anomalías en el hígado. Alrededor de los seis meses, estos ratones sufren de manera espontánea una hepatitis autoinmune caracterizada por un aumento de las transaminasas hepáticas y de los niveles de autoanticuerpos. A nivel histológico, presentan una infiltración importante de linfocitos T autorreactivos y de macrófagos, y un aumento significativo de citoquinas proinflamatorias en hígado (161). El trasplante de médula ósea de ratones controles, revierte este fenotipo indicando la importancia de los receptores TAM en las células inmunitarias para el mantenimiento de tolerancia hepática.

En condiciones no patológicas, GAS6 es expresado por las células de Kupffer mientras que los receptores TAM se encuentran principalmente en estos macrófagos y en las CEH quiescentes. Las enfermedades hepáticas, ya sean agudas o crónicas, tienen un componente inflamatorio importante, por lo que los receptores TAM representan factores claves en el desarrollo y la resolución de las mismas. Es por eso que durante la última década, los receptores TAM y sus ligandos han adquirido una función relevante en patología hepática especialmente en las células de Kupffer o macrófagos y las células estrelladas.

3.4.1 TAM y enfermedades hepáticas agudas

En relación a las enfermedades hepáticas agudas, se ha descrito un aumento de monocitos y macrófagos MERTK positivos en pacientes con insuficiencia hepática aguda. Estas células además presentan un fenotipo menos inflamatorios y con mayor capacidad fagocítica que el resto de macrófagos. En modelos animales por sobredosis de acetaminofén, también se produce este incremento de macrófagos MERTK positivos más fagocitarios. Estas células son esenciales para la resolución del daño hepático puesto que la deficiencia en MERTK provoca un incremento de la infiltración y de la actividad de neutrófilos causando inflamación y daño persistente (162).

De manera similar, la señalización de GAS6 a través de MERTK también ejerce un papel hepatoprotector en modelos de isquemia y reperfusión. Los niveles de GAS6 aumentan rápidamente tras el daño isquémico e induce la fosforilación de MERTK pero no de AXL. Esta señalización induce por un lado vías de supervivencia en los hepatocitos en condiciones de hipoxia y por otro lado, reduce la secreción de citoquinas inflamatorias en los macrófagos. Por esta razón, la deficiencia de GAS6 provoca un daño isquémico más fulminante que puede revertirse con la administración de GAS6 (163). Observaciones similares se han descrito en la resolución de la hepatitis aguda por CCl₄ en los animales carentes de GAS6 (164).

Por su parte, la deficiencia de AXL en modelos de hepatotoxicidad por LPS agrava el daño hepático y la inflamación pese al aumento de expresión de GAS6 (165). Según este estudio, AXL inhibe la activación del inflammasoma a través de la inducción de la autofagia en las células de Kupffer reduciendo la secreción de IL-1 e IL-18. Estos resultados demuestran el papel de los TAM en macrófagos en el control y resolución de la inflamación hepática aguda.

3.4.2 TAM y enfermedades hepáticas crónicas

Por lo que respecta a las enfermedades hepáticas crónicas, los receptores TAM podrían desempeñar una función importante por su presencia en macrófagos y CEH. En caso de daño hepático, aumentan en el hígado los niveles de GAS6 que son secretados tanto por las células de Kupffer como por las CEH (166). De hecho, durante su activación, las CEH secretan mayores niveles de GAS6 y aumentan la expresión de AXL (167). Este receptor promueve la expresión de genes profibrogénicos, como α -SMA o metaloproteinasas, así como vías de supervivencia y proliferación mediante la fosforilación de AKT y la activación de la vía NF- κ B. *In vivo* la importancia del eje GAS6/AXL en la activación de las CEH se confirmó observando menos fibrosis hepática en animales deficientes en AXL tras la inyección crónica de CCl₄ (168).

El polimorfismo del MERTK rs4374383 AA ha sido asociado a una expresión menor de MERTK en hígado y menor grado de fibrosis. Por el contrario, los pacientes de EHNA con fibrosis hepática muy establecida (F2-F4) sobreexpresan este receptor, como ocurre en el modelo animal MCD (169). En este estudio, la inhibición de MERTK *in vitro* induce la muerte celular de las CEH y una disminución de genes fibrogénicos como el colágeno. Pese a que los autores relacionan la expresión de MERTK con la activación de las CEH, su colocalización en

muestras histológicas de pacientes de EHNA con CD68, marcador clásico de macrófagos, sugieren que la actividad de MERTK en estas células inmunes es más relevante que en las CEH (170).

3.5 Aplicación terapéutica

Considerando la participación de los receptores TAM en distintas patologías, la intervención de su actividad podría tener un potencial terapéutico importante. Esta estrategia ha sido muy estudiada principalmente en cáncer donde los receptores TAM participan en el crecimiento y la migración tumoral así como en la resistencia a fármacos anticancerígenos.

AXL, es el receptor TAM más alterado en cáncer por lo que ha sido la diana escogida para el desarrollo de nuevos fármacos. El efecto de inhibidores de AXL ha sido analizado en diversos tipos de tumores en ensayos preclínicos y clínicos (Tabla 2), ya sea en monoterapia o en combinación con otros fármacos para combatir mecanismos de resistencia. Sin embargo, muchos de estos inhibidores no son específicos y tienen otras dianas con dominios similares a AXL como cMET o MERTK. El bemcentinib (BGB324 o R428) es un inhibidor de molécula pequeña específico de AXL con biodisponibilidad oral que bloquea su actividad a concentraciones nanomolar inhibiendo la fosforilación de AKT y otros procesos dependientes de AXL. Este inhibidor ha mostrado buenos resultados en el bloqueo de las metástasis en modelos de cáncer de mama (171), en la potenciación de la quimioterapia mediante la disminución de la inmunosupresión en cáncer pancreático (172) y en la reducción de la proliferación e invasión en células de glioma (173). Actualmente, se encuentra en fases clínicas para el tratamiento de melanoma, linfomas mieloides agudos y en carcinoma pulmonar. Asimismo, estudios preclínicos han observado efectos similares en el crecimiento y la migración tumoral con anticuerpos monoclonales inhibidores de AXL en modelos de cáncer pancreático (174) y en modelos metastásicos de cáncer de mama (175).

Inhibidores	Dianas	Fase	Inhibición de AXL	Ref.
BGB324 (R428)	AXL	Fase clínica I	IC50 (in cells) < 30 nM	(171)
SU11248 (Sunitinib)	FLT3, VEGFR2, KIT, AXL	Fase clínica I	IC50 (in vitro) = 9 nM	(176)
S49076	MET, AXL, MERTK, FGFR1/2/3	Fase clínica I	IC50 (in cells) = 56 nM	(177)
LY2801653	RON, MET, MST1R, FLT3, AXL, MERTK, TEK, ROS1, DDR1/2, MKNK1/2	Fase clínica I	IC50 (in cells) = 2 nM	(178)
BMS777607	MET, RON, FLT3, AXL, MERTK, TYRO3	Fase clínica I	IC50 (in vitro) = 1.1 nM	(179)
MGCD265	MET, RON, VEGFR1/2/3, TIE-2, AXL	Fase clínica II	Sin datos	(180)
SKI606 (Bosutinib)	AXL, SRC/ABL	Fase clínica II	IC50 (in cells) = 0.34–1.65 µM	(181)
MP470 (Amuvatinib)	KIT, PDGFRα, Axl	Fase clínica II	IC50 (in cells) < 1 µM	(182)
GSK1363089 (Foretinib)	AXL, MET, VEGFR2, RON, TIE2, KIT, MERTK	Fase clínica II	IC50 (in cells) <100 nM	(183)
XL184 (Cabozantinib)	MET, TIE, VEGFR2, RET, KIT, AXL, FLT3	Fase clínica III	IC50 (in cells) = 42 nM	(184)

Tabla 2: Inhibidores de AXL en fase clínica.

Dianas de inhibidores de AXL y sus constantes de inhibición. Adaptado de Axelrod et al., 2014 (185) y Myers et al., 2016 (186)

Aunque ha sido menos explorada, la inhibición de MERTK también induce un efecto antitumoral. En células de melanoma, el inhibidor UNC1062, selectivo de MERTK, inhibe su señalización reduciendo la proliferación y la invasión, y promoviendo la apoptosis (150). Por otro lado, el anticuerpo monoclonal MER590 es capaz de reducir la expresión y activación del receptor induciendo su internalización y degradación. Esta disminución provoca la inhibición de la señalización por AKT o ERK1/2 y por consecuencia sensibiliza a las células a carboplatino aumentando la apoptosis en cáncer de pulmón de células no pequeñas (187).

No obstante, dada la importancia de estas moléculas en la regulación de la inflamación, la inhibición simultánea de AXL y MERTK mediante fármacos puede representar un problema sobre todo para tumores desarrollados en un contexto inflamatorio. Es el caso de modelos animales de cáncer de colon asociado a colitis, donde la deficiencia de MERTK y AXL aumenta la señalización proinflamatoria e incrementa la aparición de estos tumores (188). Estos resultados resaltan que, pese a la alta expresión de TAM en muchos cánceres, su inhibición sistémica puede fomentar efectos adversos derivados de la desregulación de poblaciones de macrófagos alterando la homeostasis tisular (185). Por lo que el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento podría centrarse en dirigir estos inhibidores a las células dianas evitando otros tipos celulares donde los TAM ejercen una función protectora.

4 Carcinoma hepatocelular

El cáncer hepático, cuya incidencia está en aumento, es el sexto cáncer más común y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer (189, 190). Entre los tumores hepáticos primarios, el carcinoma hepatocelular (CHC) es el más común, constituyendo un 90% de los casos. Este neoplasma maligno de las células parenquimales del hígado es muy heterogéneo a nivel etiológico, clínico y molecular.

4.1 Epidemiología y etiología

El desarrollo de CHC está muy ligado a las enfermedades hepáticas crónicas, siendo el principal factor de riesgo la cirrosis derivada de cualquier patología de las que destacan las infecciones víricas por el virus de la hepatitis B y C, y la esteatohepatitis alcohólica o no alcohólica. Otros factores de riesgo son la intoxicación por aflatoxina B1 y en menor medida la hemocromatosis, la deficiencia de α 1-antitripsina o enfermedades metabólicas raras. Debido a esta diversidad en la etiología, la epidemiología mundial del CHC es muy diversa y dinámica, y varía según la incidencia de los factores de riesgo. El mayor número de CHC se concentra en el este de Asia y en África sub-sahariana, donde la principal causa es la infección de hepatitis B y la exposición a aflatoxina B1. Por otro lado, en Europa, Japón y Estados Unidos, la infección por virus de la hepatitis C y la esteatohepatitis alcohólica son los principales responsables de CHC (191, 192). Sin embargo, en estas poblaciones, los casos derivados de virus C están disminuyendo mientras que los relacionados con la EHNA están en auge (193, 194).

La prevención del CHC se basa en la disminución de los factores de riesgo, ya sea a través de la vacunación contra la hepatitis B (195), del control de la propagación del virus B y C, y del tratamiento con antivirales para frenar la progresión a cirrosis (196, 197), así como la reducción del consumo de alcohol y el fomento de un estilo de vida saludable (198).

4.2 Patogénesis y mecanismos moleculares

La patogénesis del CHC es un proceso lento y complejo. En un contexto cirrótico e inflamatorio producido por las distintas etiologías, los hepatocitos y sus precursores reciben múltiples señales que alteran la supervivencia y proliferación celular desencadenando lesiones preneoplásicas. Inicialmente se observan nódulos con un nivel de displasia bajo (LGDNs, *low grade dysplastic nodules*) que evolucionan gradualmente a nódulos de mayor grado

de displasia (HGDNs, *high grade dysplastic nodules*) y posteriormente a estados iniciales de hepatocarcinoma y a CHC avanzado (199) (Figura 5). Este desarrollo es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, perturbando numerosas vías de señalización y generando tumores complejos y muy heterogéneos (200). En raras ocasiones el CHC se desarrolla en hígados no fibróticos resultado de la transformación maligna de adenomas hepáticos (201).

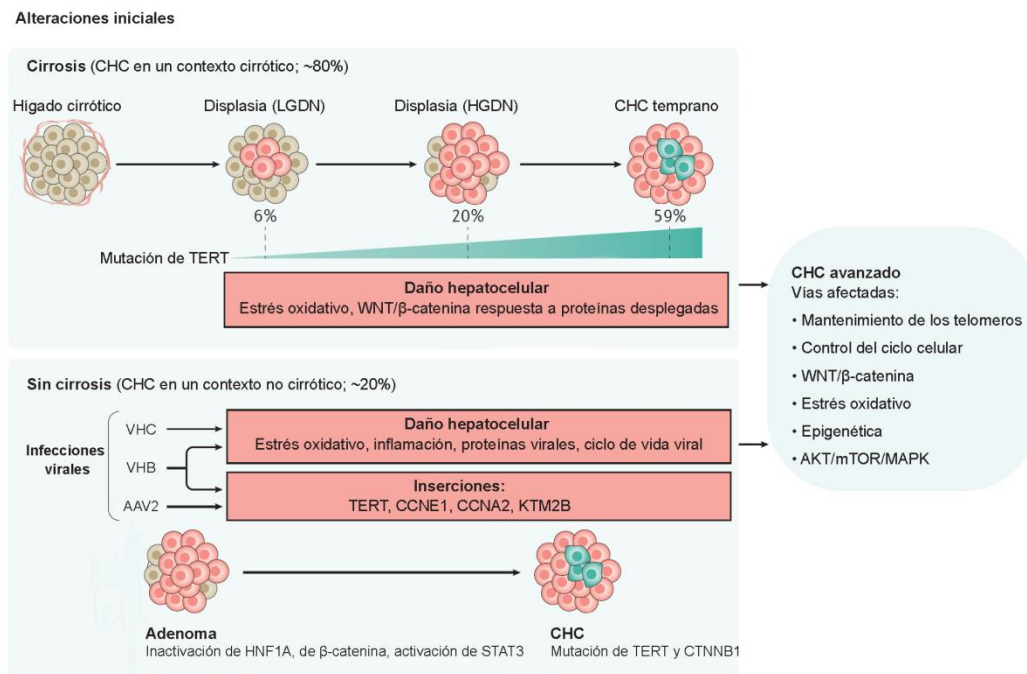


Figura 5: Desarrollo del CHC en hígados cirróticos y no cirróticos.

Aproximadamente el 80 % de los tumores se desarrollan en contexto cirrótico. Durante los estadios preneoplásicos, las células acumulan una serie de alteraciones que inducirán la transformación maligna y la progresión a CHC avanzado. Una gran mayoría presentan mutaciones relacionadas con el gen TERT. Figura modificada de (202).

Pese a la heterogeneidad, se han podido identificar algunos mecanismos involucrados en el desarrollo inicial de CHC específicos de algunas etiologías (203). En general, la cirrosis induce numerosas vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, la activación de NF-κB o la producción de TGF-α que predisponen el desarrollo de CHC. Por otro lado, el virus de la hepatitis B, induce hepatocarcinogenesis a través de diversos mecanismos. Por un lado, su ADN vírico se integra en el genoma humano produciendo aberraciones cromosómicas (204) y alterando la expresión de genes endógenos relacionados con la proliferación y supervivencia celular como el gen TERT, subunidad de la telomerasa (205). Por otro lado, la proteína vírica HBx es capaz de unirse e inactivar p53 alterando su función en apoptosis y senescencia (206). Por su parte, en hepatitis por virus C, la proteína HCx actúa como ligando de la vía Wnt (207) y está implicada en la activación de la vía MAPK (208). Finalmente, se conoce que la aflatoxina B1 es capaz de unirse a los residuos de guanina del ADN generando mutaciones especialmente en el gen TP53 (209). Sin embargo, ninguna de las clasificaciones moleculares propuestas hasta el momento ha permitido predecir la progresión tumoral o diferenciar tratamientos más efectivos. A continuación se detallan algunas de estas vías implicadas en el desarrollo, la proliferación e inflamación relacionadas con CHC.

4.2.1 Diferenciación celular y desarrollo

Una de las vías activadas frecuentemente en CHC es la vía WNT/β-catenina. Se observan mutaciones de CTNNB1 en alrededor del 30% de los casos de CHC y en menor frecuencia en genes como AXIN1 o APC (200).

La activación de esta vía implica la entrada a núcleo de la β -catenina y la consecuente expresión de genes oncogénicos como la proteína survivina (BIRC5) o ciclina D1.

La señalización por Hedgehog (Hh) es otra vía fundamental para la embriogénesis y participa en la diferenciación de los hepatocitos (210). Se ha descrito que los hepatocitos maduros no tienen actividad Hh, no obstante algunos de sus componentes, como GLI1 o SMO, se encuentran sobreexpresados en CHC comparado con el tejido adyacente. La activación de esta vía induce la expresión de factores de crecimiento como EGF o FGF y otras proteínas relacionadas con apoptosis y proliferación como BCL-2 y ciclina D1 (211).

Otras vías importantes en el desarrollo embrionario, como Notch e Hippo, se han relacionado igualmente con el desarrollo de CHC. En un gran número de muestras de CHC se observan aumentados genes relacionados con la vía Notch y su activación en modelos animales promueve la formación de tumores (212). Por otro lado, en un 30% de CHC se observa la inactivación de la vía Hippo y por consecuencia una mayor actividad de Yap1 en el núcleo que favorece el crecimiento tumoral (213).

4.2.2 Supervivencia y proliferación celular

La mayoría de células adultas del organismo restringe la actividad telomerasa para evitar una proliferación incontrolada, sin embargo, en muchos tumores esta actividad se recupera. Es el caso de CHC, donde se observa una sobreexpresión de la telomerasa en un 90% de los casos producida principalmente por amplificaciones del gen TERT o mutaciones en su promotor. Esta expresión aberrante favorece la inmortalidad de células tumorales (214).

Por otro lado, se han asociado numerosos factores de crecimiento al desarrollo y progresión de CHC y en diversos estudios se han descrito la sobreexpresión o sobreactivación de receptores de estos factores en CHC como IGF-1R (215) o EGFR (216). MET, el receptor de HGF, factor crítico en la regeneración hepática, se relaciona frecuentemente con progresión tumoral y metástasis, y se encuentra activado en aproximadamente un 40% de los pacientes con CHC (217). A nivel intracelular, estos receptores inducen vías de señalización entre las que destacan la vía de las MAPK y la vía de AKT. Ambas vías están frecuentemente activadas en CHC y promueven la proliferación y la supervivencia celular (218).

Respecto a la vía de las MAPK, a diferencia de otros tumores, en CHC RAS está raramente mutado, pero la sobreexpresión de los receptores de factores de crecimiento y la disminución de inhibidores de la vía producen un aumento de la actividad de RAS (219). Éste inicia la cascada de fosforilación que finalizará con la activación de ERK1/2 promoviendo la proliferación celular y la angiogénesis e inhibiendo la apoptosis (220).

Por otro lado, la vía PI3K/AKT también juega un papel importante en la progresión de CHC. Son comunes las mutaciones en PTEN, fosfatasa inhibidora de AKT (1-3% de los casos) (202) incrementando la desregulación de esta vía. La fosforilación de AKT induce la proliferación y supervivencia celular mediante la activación de ciclina D1 y la inhibición de la proteína proapoptótica BAD entre otras dianas. mTORC1 que también es activada por AKT, parece tener un rol importante en la progresión de CHC puesto que su inhibición reduce el crecimiento tumoral en modelos xenógrafos (221).

4.2.3 Angiogénesis

El carcinoma hepatocelular es un tumor muy vascularizado por lo que los procesos angiogénicos, favorecidos por el microambiente tumoral, son mecanismos muy importantes para la progresión del tumor. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el principal responsable de promover la angiogénesis por lo que tiene un papel esencial en la hepatocarcinogénesis y metástasis (222). La expresión de este factor así como su

receptor VEGFR está aumentado en la mayoría de CHC (223) induciendo la formación de vasos más permeables y la creación de una red vascular débil con flujo sanguíneo anormal (224) La angiopoyetina 1 y 2, factores como EGF o PDGF y otras moléculas actúan sobre las células endoteliales facilitando la angiogénesis. De esta manera, se generan regiones poco vascularizadas desencadenando un reparto irregular de fármacos y oxígeno. Estos procesos hipóxicos, que pueden producir necrosis, promueven la secreción de más VEGF y el crecimiento del tumor; y se han relacionado con la resistencia a fármacos (225).

4.2.4 Inflamación y microambiente tumoral

Es bien conocida la conexión entre inflamación y cáncer; y ésta es evidente en CHC donde alrededor de 90% se desarrollan en pacientes con enfermedades hepáticas crónicas. El microambiente juega un papel importante en la carcinogénesis, así como en la progresión y la metástasis tumoral.

En un hígado inflamado, las células inmunes, las CEH y las células endoteliales interactúan con los hepatocitos adyacentes mediante citoquinas y factores de crecimiento que favorecen la regeneración hepática pero que puede derivar hacia la transformación maligna. Se ha demostrado que moléculas secretadas por estas células como $TNF\alpha$, IL-6, linfotóxina α o HGF son capaces de promover el crecimiento de hepatocitos (226-228). Estas señales inducen dos vías de señalización, muy importantes en inflamación, que se han relacionado con el desarrollo de CHC: NF- κ B y JAK-STAT (226). Por ejemplo, se ha demostrado en modelos *in vivo* que $TNF\alpha$ secretado por macrófagos produce en los hepatocitos a través de NF- κ B resistencia a apoptosis y con ello promueve el crecimiento tumoral (229). Resultados parecidos se han obtenido mediante la activación *in vitro* del factor de transcripción STAT3 por IL-6 que provoca una expansión de las células cancerígenas contribuyendo al crecimiento tumoral (229). Otra característica de las enfermedades hepáticas crónicas, como la translocación bacteriana, intensifica esta inflamación a través de TLR4 contribuyendo a la progresión del tumor (230).

Esta proliferación de hepatocitos producida en respuesta a la inflamación podría resultar en mutaciones por daño en el ADN (231). Paralelamente, la elevada actividad de las células inmunes implica un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno que producen alteraciones genómicas y favorecen la aparición de mutaciones oncogénicas (232).

Una vez establecido el tumor, los macrófagos adquieren un fenotipo más inmunosupresor y predominan los linfocitos de respuesta Th2 produciendo un cambio en el microambiente. Aumenta la secreción de IL-10 y TGF- β fomentando la angiogénesis y reduciendo la respuesta inmune antitumoral. Por lo tanto, esta inmunosupresión contribuye al crecimiento tumoral y a la resistencia a ciertas terapias (233, 234).

La comunicación entre las CEH, activadas en las enfermedades crónicas, y hepatocitos o células tumorales es también un mecanismo relevante en el desarrollo y la progresión tumoral. Además de promover la inflamación, las CEH activadas son una fuente de factores capaces de inducir la transformación de los hepatocitos como IL6 o HGF, y de favorecer su movilidad como VEGF y MMP9 (235, 236). El crecimiento tumoral y la angiogénesis también estarán favorecidas por otras proteínas secretadas por las CEH como la angiogenina, o TGF- β entre otras (237, 238).

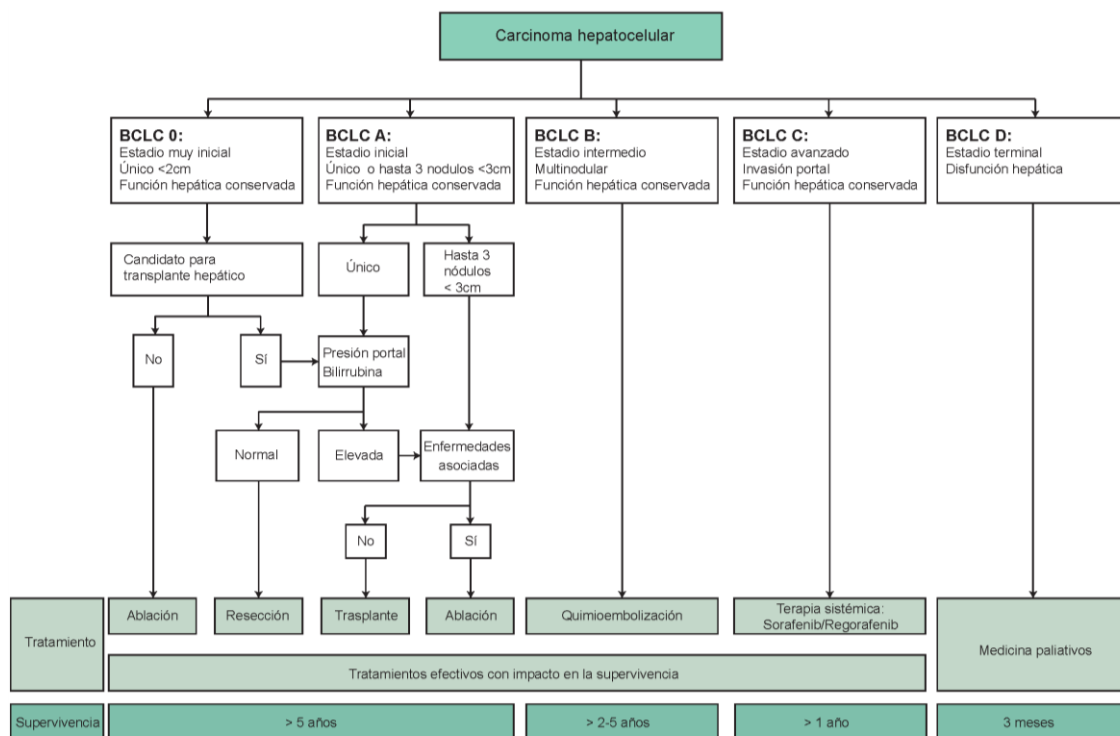


Figura 6: Sistema BCLC de estratificación de pacientes con CHC

Esta clasificación basada en el número y tamaño del tumor y en la funcionalidad hepática permite seleccionar el tratamiento más eficaz para cada grupo. (239)

4.3 Estrategias terapéuticas

4.3.1 Diagnóstico y tratamiento del CHC

4.3.1.1 Vigilancia y diagnóstico

Con el objetivo de reducir la mortalidad, se han establecidos pautas de vigilancias que permitan un diagnóstico temprano en poblaciones con mayor riesgo. Esta vigilancia se basa en estudios de coste-efectividad que determinan los grupos de pacientes que pueden beneficiarse. Por lo tanto, se recomienda vigilar cada 6 meses mediante pruebas de imagen por ultrasonidos a pacientes con alto riesgo de desarrollar CHC como los cirróticos, excepto en etapas avanzadas en las que el tratamiento antitumoral no sería eficaz, o los pacientes de hepatitis B sin cirrosis. Los marcadores séricos, como la α -fetoproteína, tienen una sensibilidad y una especificidad baja por lo que no se consideran como alternativa de vigilancia (240).

Esta vigilancia ha permitido aumentar el porcentaje de detección precoz de CHC en países desarrollados, sin embargo el diagnóstico tardío sigue siendo habitual. En el caso de pacientes cirróticos, el diagnóstico definitivo de CHC puede realizarse con la observación de nódulos superiores a 1cm mediante técnicas no invasivas de imagen. En caso de duda o de no padecer cirrosis, el diagnóstico debe realizarse mediante en el análisis histológico en el que se recomienda inmunotinción de GPC3, HSP70 y glutamina sintetasa para diferenciar displasias de CHC inicial (241).

4.3.1.2 Tratamiento

Una vez diagnosticado, existen distintos sistemas de estratificación de pacientes para elegir el tratamiento más adecuado según su pronóstico y la funcionalidad hepática. La aparición en 1999 del sistema de clasificación BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) revolucionó el tratamiento de CHC y su validación y continuas actualizaciones han convertido esta método de estratificación en una referencia mundial del manejo eficaz de los pacientes (Figura 6) (242, 243).

Este sistema diferencia 5 grupos de pacientes: BCLC 0 para los tumores muy tempranos, BCLC A para pacientes con hasta 3 nódulos menores de 3cm y función hepática conservada, BCLC B para pacientes sin síntomas con tumores multifocales pero sin invasión vascular, BCLC C para carcinomas en estado avanzado con invasión vascular y expansión extrahepática y por último, BCLC D que incluye pacientes con función hepática muy deteriorada. Esta clasificación permite seleccionar el tratamiento con más posibilidad de éxito para cada grupo. Siguiendo esta estratificación, los tumores tempranos, BCLC 0 y BCLC A, son candidatos a cirugías de resección, ablación local con radiofrecuencia o trasplante hepático mientras que la quimioembolización, es decir la administración de quimioterapias directamente a la red vascular del tumor, se recomienda en pacientes BCLC B. En 2008, el ensayo clínico SHARP (*Sorafenib Hepatocellular Carcinoma Assessment Randomized Protocol*) demostró que el sorafenib, un inhibidor multiquinasa, aumentaba 3 meses la supervivencia de pacientes con CHC avanzado que hasta entonces no disponían de ningún tratamiento eficaz (244). Desde entonces, el sorafenib se convirtió en la terapia sistémica de referencia para la categoría BCLC C mientras que los pacientes en estadios finales (BCLC D) son dirigidos a cuidados paliativos.

El sorafenib fue el primer fármaco aprobado para CHC en estado avanzado que aumenta la supervivencia pese a que su efecto es limitado, generando efectos adversos y desarrollando resistencia y progresión tumoral. Por ello, durante muchos años, se convirtió en una necesidad médica encontrar nuevos tratamientos o combinaciones que mejoraran el tratamiento con sorafenib. Después de resultados negativos en ensayos clínicos de muchos fármacos (245), en 2017 se confirma que otro inhibidor multiquinasa, el regorafenib, prolonga la supervivencia general y la ausencia de progresión en pacientes que han dejado de responder a sorafenib (246). De esta manera, se establece el regorafenib como tratamiento de segunda línea en pacientes tolerantes a sorafenib pero con progresión tumoral.

Fármaco	Tratamiento	Tipo	Dianas	Estudio
Sorafenib	Primera línea	Inhibidor multiquinasa	VEGFR2-3, PDGFR- β , FGFR1-2, Flt-3, KIT, RET, RAF-1, B-RAF	SHARP
Regorafenib	Segunda línea	Inhibidor multiquinasa	VEGFR1-3, PDGFR α/β , FGFR1-2, Flt-3, KIT, RET, TIE2, DDR2, RAF-1, B-RAF	RESORCE
Cabozantinib	Segunda línea	Inhibidor multiquinasa	TIE-1, TIE-2, FLT3, MET, KIT, RET, AXL, VEGFR	CELESTIAL
Nivolumab	Segunda línea	Inhibidor de check-points	PD-1	CheckMate 459
Lenvatinib	Primera línea	Inhibidor multiquinasa	VEGFR1-3, FGFR1-4, PDGFR α , RET, KIT	REFLECT

Tabla 3: Tratamiento sistémico del CHC avanzado.

Fármacos aprobados hasta el momento para el tratamiento sistémico de CHC avanzados. Predominan inhibidores multiquinasas administrados como tratamientos de primera o segunda línea mientras que el nivolumab, anticuerpo monoclonal contra PD1 está aprobado hasta el momento en segunda línea.

Otros inhibidores multiquinasa han dado buenos resultados en ensayos clínicos recientes. Lenvatinib, inhibidor de VEGFR, FGFR, Ret, c-Kit y PDGFR α , ha mostrado no ser inferior al sorafenib en primera línea (247) mientras que el cabozantinib, inhibidor de MET, AXL y VEGFR reduce la mortalidad y aumentado la supervivencia sin progresión como tratamiento de segunda línea (248). Por otro lado, dado el contexto inflamatorio de CHC y el buen resultado en otros tumores sólidos, las inmunoterapias han adquirido gran importancia en el tratamiento de CHC. Estudios con Nivolumab, un anticuerpo monoclonal contra PD-1, demuestran su seguridad y su eficacia

mejorando la supervivencia en pacientes tratados o no previamente con sorafenib, lo que ha acelerado su aprobación como tratamiento de segunda línea (249).

Tras años de investigación para encontrar una terapia eficaz para CHC avanzado (250), estos resultados ofrecen nuevas alternativas para pacientes que no toleran o no responden a sorafenib (Tabla 3). Sin embargo, próximamente estos avances originarán nuevas dificultades a nivel médico para decidir el tratamiento más eficaz para cada paciente. Por eso resulta evidente la necesidad de encontrar marcadores que ayuden a distinguir los pacientes que puedan beneficiarse de las distintas terapias.

4.3.2 *Inhibidores de receptores tirosina quinasa*

4.3.2.1 *Sorafenib*

RAF es un componente de la vía MAPK mutado o alterado en muchos tipos de cáncer, lo que la convirtió una diana clara para el tratamiento antitumoral. El desarrollo de fármacos inhibidores de RAF condujo a la selección del sorafenib (BAY 43-9006; Nexavar) como candidato para la práctica clínica (251). Los análisis bioquímicos confirmaron una potente inhibición de RAF, reduciendo la fosforilación de MEK y ERK, así como la inhibición de receptores tirosina quinasa como VEGFR, PDGFR- β , FGFR1, Flt-3, KIT y RET, también implicados en carcinogénesis (252). Esta inhibición reduce la proliferación celular y tiene un efecto antiangiogénico, por lo que el sorafenib reduce el crecimiento tumoral *in vivo* en múltiples modelos xenógrafos de tumores humanos como el de colon, ovario, melanoma, de mama y hepatocarcinoma (252-255) (Figura 7).

Debido a su biodisponibilidad oral y su larga vida media en humanos (35 horas), se inician ensayos clínicos de fase 1 en el año 2000 en pacientes con tumores sólidos avanzados (256). Se confirmó la tolerancia a sorafenib pese a la aparición de efectos adversos en algunos pacientes (diarrea o reacciones cutáneas mayoritariamente) y se observó un prometedor efecto antitumoral por lo que se iniciaron ensayos clínicos de fase 2 y 3. Se demuestra un beneficio en la supervivencia en pacientes de carcinoma renal de células claras tratados con sorafenib en 2007 y en pacientes de CHC en 2008 (244, 257) lo que lleva a la aprobación de este fármaco en tratamiento para pacientes con estadios avanzados de estos tumores.

Sin embargo, la eficacia del sorafenib es limitada: algunos pacientes no responden al tratamiento mientras que otros acaban progresando. Esta resistencia ha conducido al estudio de los mecanismos de acción y de resistencia del sorafenib en células de CHC.

Mediante la inhibición de RAF el sorafenib ejerce su efecto antiproliferativo inhibiendo señales dependientes de la vía MAPK. En líneas celulares de CHC, se observa una reducción de la fosforilación de MEK y ERK así como de los niveles de ciclina D1 tras el tratamiento con sorafenib que disminuye su proliferación (254). Por otro lado, PDGFR- β y VEGFR son factores esenciales para la angiogénesis por lo que su inhibición induce apoptosis en células endoteliales y reduce la formación de vasos (258) limitando el flujo sanguíneo e inhibiendo el crecimiento tumoral en modelos xenógrafos de CHC (254).

En cambio, otras vías implicadas en el desarrollo de CHC como PI3K/AKT o NF- κ B, no son diana del sorafenib y podrían ser responsables de la aparición de resistencia induciendo proliferación celular (259). De hecho, el tratamiento con sorafenib activa AKT y sus dianas en células de CHC (260) y su fosforilación está aumentada en células resistentes (261).

Asimismo, el sorafenib es capaz de reducir la viabilidad induciendo muerte celular en células de CHC. Se conoce que el sorafenib promueve la degradación de la proteína MCL-1 vía proteasoma (262) y además reduce su translación mediante la reducción de la fosforilación de eIF4E (263). Estos mecanismos reducen rápidamente los niveles proteicos de MCL-1 favoreciendo la inducción de apoptosis.

La autofagia también ha sido asociada a la resistencia a sorafenib. Este proceso de reciclaje celular está asociado a una mayor supervivencia celular y a crecimiento tumoral. Diversos estudios *in vitro* han demostrado la inducción de la autofagia en presencia de sorafenib observando una mayor lipidación de LC3, mayor formación de autofagosomas (264) y favorecida por la disminución de MCL-1 que libera la proteína asociada a autofagia Beclin (265). Esta autofagia generaría resistencia a la muerte celular y su inhibición resulta en la reducción de la proliferación de células de CHC *in vitro* y del crecimiento tumoral *in vivo* en presencia de sorafenib (266). No obstante, una autofagia excesiva induce apoptosis por lo que el papel del sorafenib y la autofagia en CHC crea cierta controversia (267).

Finalmente, la producción de ROS en respuesta a agentes citotóxicos es algo común en células tumorales y se ha probado *in vitro* que el sorafenib induce un aumento de O_2^- , NO y H_2O_2 . Esta producción de ROS sería necesaria para inducir la muerte celular ya que el tratamiento con antioxidantes como miméticos del enzima superóxido dismutasa reduce la lisis celular e incrementa el crecimiento tumoral en ratones tratados con sorafenib (268).

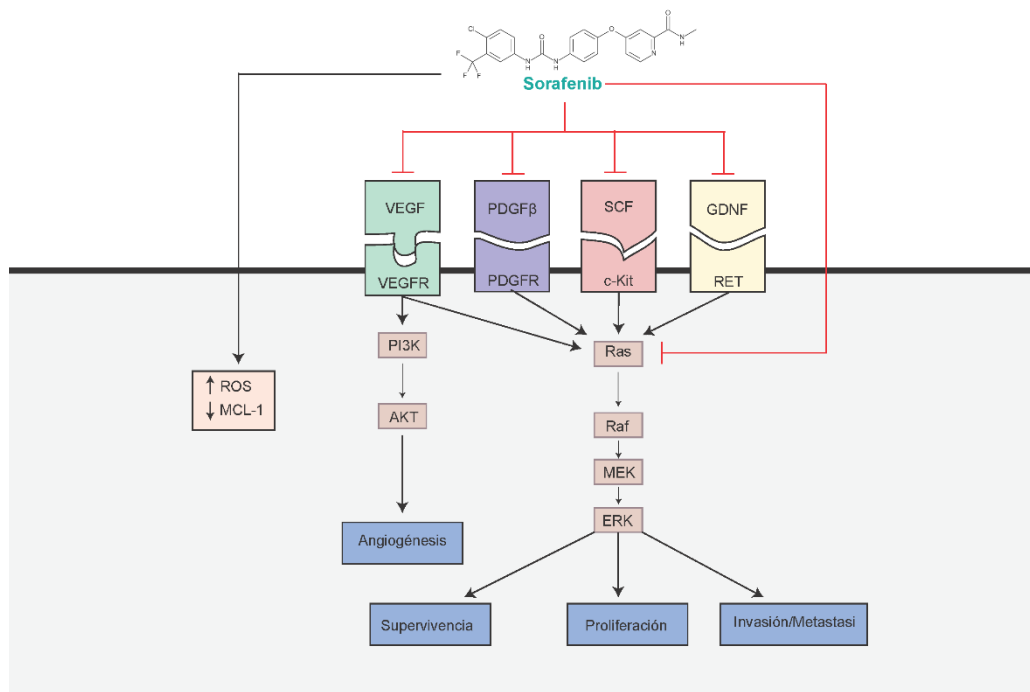


Figura 7: Dianas del sorafenib.

El sorafenib inhibe la proteína tirosina quinasa RAF y los receptores VEGFR, PDGFR- β , FGFR1, Flt-3, c-Kit y RET. Además, induce la producción de ROS y disminuye los niveles de MCL-1.

4.3.2.2 Regorafenib

En 2011, aparece el primer estudio que describe el potencial antitumoral del regorafenib (BAY 73-4506), otro inhibidor oral de tirosina quinasa desarrollado por Bayer. El regorafenib se diferencia estructuralmente del sorafenib por un átomo de flúor en grupo fenol central pero a nivel farmacológico es un inhibidor mucho más potente y amplio. Además de VEGFR y PDGFR- β , el regorafenib inhibe también TIE2, que junto a angiogenina participa en la señalización angiogénica. Además, esta proteína es expresada por monocitos y su activación induce la liberación de múltiples factores proangiogénicos sobre todo en condiciones hipóxicas (269). Por ello, el regorafenib resulta más eficaz en la inhibición de la angiogénesis que el sorafenib. También inhibe de manera

más potente a los receptores RET y KIT y a RAF. Su administración reduce el crecimiento tumoral y la formación de vasos sanguíneos en modelos xenógrafos de carcinoma renal o de cáncer colorrectal entre otros (270).

El ensayo clínico RESORCE probó la eficacia del regorafenib en pacientes con CHC avanzado que no respondieron a sorafenib (246), convirtiéndose así en el primer fármaco aprobado como segunda línea. Pese a su estructura similar, sorafenib y regorafenib inducen un patrón de expresión proteico significativamente distinto en tumores xenógrafos, lo que podría explicar la eficacia del regorafenib en tumores resistentes a sorafenib (271). Dada su reciente aprobación, existen pocos datos sobre las limitaciones del regorafenib y la adquisición de resistencia; y actualmente sólo se administra en pacientes tolerantes a sorafenib.

5 Mecanismos de muerte celular

La muerte celular es un proceso complejo estudiado desde hace décadas. Hasta hace relativamente poco se diferenciaba entre la apoptosis o la necrosis, sin embargo la evidencia de una mayor regulación de los procesos de muerte y el descubrimiento de nuevos tipos de muerte celular como la necroptosis o piroptosis han cambiado la perspectiva de este campo de investigación (272).

5.1 Apoptosis

Descrita en los años 70, la apoptosis se ha observado en múltiples formas de vida (273) y es necesaria para el desarrollo de organismos así como el mantenimiento homeostático en condiciones fisiológicas y patológicas. La apoptosis es un tipo de muerte regulada que requiere la activación de las caspasas. La activación de las caspasas induce una cascada de proteólisis provocando la escisión de muchas proteínas dianas que conducirá a la degradación del ADN y la reorganización del citoesqueleto. Por ello, la apoptosis se caracteriza por la condensación y fragmentación nuclear y la formación de cuerpos apoptóticos que facilita su eliminación y limita la respuesta inmunitaria. Existen dos mecanismos que inducen la activación de las caspasas dependiendo si las células reciben estímulos apoptóticos externos o intracelulares (274).

En la vía intrínseca, también llamada vía mitocondrial, los inductores de muerte son el estrés y el daño celular o genómico. Las proteínas de la familia Bcl-2, que se describirán posteriormente, regulan este proceso mediando la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP). Esta permeabilización provoca la liberación de proteínas mitocondriales como citocromo c, AIF o SMAC al citosol e induce la formación del complejo apoptosoma (Figura 8). Este complejo está formado por el citocromo c, la proteína adaptadora APAF1 y la caspasa 9 que en presencia de ATP es autoactivada y como resultado activa caspasas efectoras (275).

En cambio, en la vía extrínseca, los receptores de muerte como el receptor de TNF o el receptor FAS son activados por sus ligandos provocando su oligomerización. Estos receptores reclutan proteínas adaptadoras como TRADD o FADD que inducen la autoactivación de caspasa 8 o 10. Estas caspasas activan las caspasas efectoras iniciando el proceso apoptótico. Esta vía converge con la intrínseca mediante la escisión de la proteína de la familia Bcl-2, BID, por caspasa 8.

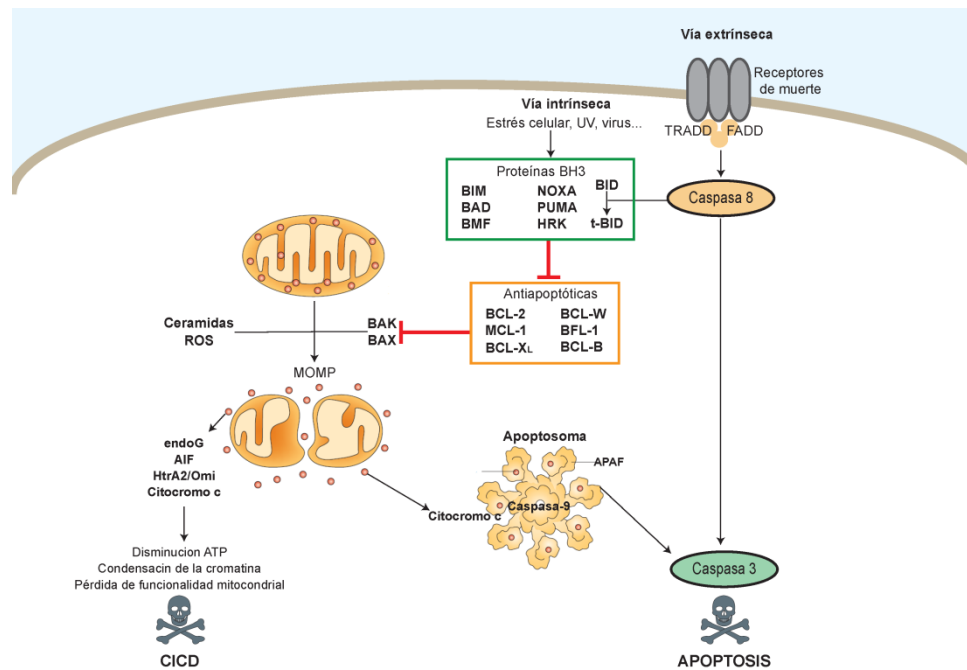


Figura 8: Muerte celular dependiente e independiente de caspasa.

La activación de la vía extrínseca induce la escisión de la caspasa 8 que activará las caspasas efectoras. En la vía intrínseca, diferentes señales alteran el equilibrio entre proteínas pro y antiapoptóticas induciendo la formación de oligómeros de BAK y BAX en la membrana mitocondrial. La salida del citocromo c induce en el citosol la formación del apoptosoma y la activación de caspasa efectoras. En la muerte independiente de caspasas, la permeabilización de la membrana aumenta su disfuncionalidad y la degradación de ADN y proteínas. Figura modificada de Youle et al., 2008 (276).

5.2 Muerte celular independiente de caspasa

Las caspasas son necesarias para llevar a cabo la apoptosis, pero otros mecanismos de muerte no requieren esta actividad. La muerte celular independiente de caspasa (CICD, *caspase independent cell death*) se caracteriza por la inducción de MOMP, la acumulación de autofagosomas y condensación nuclear periférica aunque estos eventos pueden variar según el estímulo o el tipo celular. Sin embargo, no se observa fragmentación del ADN, externalización de la fosfatidilserina ni activación de las caspasas (277).

Al contrario de la apoptosis, la CICD no ocurre en todos los animales y no se ha observado en *C.elegans* o en *Drosophila melanogaster* probablemente por la ausencia de MOMP. En células eucariotas, la CICD se ha descrito *in vitro* e *in vivo* en ausencia de componentes de apoptosoma o en presencia de inhibidores de caspasa pero también en condiciones fisiológicas como en cardiomiocitos con baja expresión de APAF1 (278) o durante la pérdida de las membranas interdigitales de las extremidades (279).

Aunque las células pueden sobrevivir a la MOMP por no realizarse completamente o mediante autofagia (280, 281), este proceso parece ser el desencadenante de la CICD ya sea mediante la pérdida de funcionalidad de la mitocondria o debido a la acción de las proteínas liberadas al citosol. La mitocondria es responsable de muchas funciones celulares importantes y durante el proceso de CICD, la pérdida de potencial de membrana y la inducción de MOMP provocan alteraciones en la cadena respiratoria y la disminución de la producción de ATP, así como alteraciones en otras funciones de la mitocondria (Figura 8). Por otro lado, también se alteran los procesos de fusión y fisión aumentando la fragmentación de la red mitocondrial. La liberación de proteínas como AIF o la endonucleasa G podrían participar en este tipo de muerte induciendo la condensación y degradación del ADN (282).

6 Metabolismo de esfingolípidos

Los esfingolípidos son un grupo de lípidos bioactivos presentes en muchos organismos que participan en la señalización intracelular regulando diferentes funciones celulares. Considerados durante años únicamente como componentes estructurales de las membranas, se ha descrito su contribución tanto en dominios lipídicos, donde controlan la endocitosis o señalización intracelular de receptores, como en numerosos procesos patológicos relacionados con muerte y proliferación celular. Además, diferentes situaciones patofisiológicas son causadas por alteraciones intracelulares del metabolismo esfingolipídico y muchas de las funciones otorgadas a los esfingolípidos tienen importancia en la oncogénesis y la respuesta a tratamiento. Debido a ello, terapias basadas en alterar la composición lipídica están siendo estudiadas para enfermedades relacionadas con esfingolípidos (283).

6.1 Estructura y metabolismo de los esfingolípidos

Existen numerosas especies de esfingolípidos que comparten una estructura muy parecida basada en la esfingosina. Este aminoalcohol formado por 18 carbonos, está unido a un ácido graso de longitud variable mediante un enlace amida. Los esfingolípidos se clasifican en cuatro subfamilias: bases esfingoides, ceramidas, glicoesfingolípidos, y fosfoesfingolípidos; según el grupo que sustituye el grupo alcohol (radical hidrógeno o estructuras más complejas como azúcares o fosfocolinas).

Los esfingolípidos inician su síntesis de *novo* en el retículo endoplasmático tras la acción coordinada de la serin-palmitoiltransferasa (SPT) que cataliza la condensación de serina y palmitoil-CoA, y de las ceramida sintasas (CerS) que añaden un grupo acilo. Se obtienen así ceramidas, base del metabolismo esfingolipídico, cuya producción estará limitada por la disponibilidad de ácido palmítico, aunque puede generarse a partir de otros ácidos de cadena larga como el mirístico o esteárico (284). La longitud, entre C14 y C30, y la saturación de los ácidos grasos depende de los diferentes enzimas CerS cuya expresión es específica del tipo celular y tejido. La CerS2, que genera ceramidas de cadenas largas, es la más predominante sobre todo en el hígado (285). Una vez formadas, las ceramidas son enviadas al aparato de Golgi ya sea mediante transporte vesicular o mediante la proteína de transferencia de ceramida (CERT) para sintetizar esfingomielina o glucosilceramidas (Figura 9).

La ceramida también puede ser generada rápidamente a partir de la esfingomielina de las membranas tras la activación de fosfolipasas específicas, las esfingomielinasas (SMasa). Esta hidrólisis suele realizarse en respuesta a mecanismos mediados por receptores celulares, estrés oxidativo o diversas drogas (286).

Las ceramidas pueden transformarse en otros esfingolípidos como glucosilceramida mediante la glucosilceramida sintasas (GCS) o esfingosina mediante las ceramidasas (CDase) que puede ser fosforilada por la esfingosina quinasa. La esfingosina-1-fosfato (S1P) es secretada para actuar de manera paracrina o autocrina a través de su receptor (SP1R) mientras que la esfingosina puede reciclarse formando ceramida en el retículo endoplasmático para generar nuevos esfingolípidos (287).

Los esfingolípidos tienen un papel dual en muchas funciones como por ejemplo la inducción de muerte celular por las ceramidas y de la supervivencia en el caso de la esfingosina-1-fosfato (S1P) o la ceramida-1-fosfato (288). Por lo tanto, el metabolismo de los esfingolípidos genera un equilibrio donde no sólo importan los niveles de estas moléculas sino también la expresión de enzimas que las conviertan en otras.

6.2 Funciones y señalización regulada por esfingolípidos

Los esfingolípidos participan en un amplio número de procesos celulares desde la proliferación y el ciclo celular, a la muerte celular y hasta la respuesta inmune. Distintos estímulos, como citoquinas, estrés celular, radiación, hipoxia o agentes quimioterapéuticos inducen la producción de ceramidas mediante síntesis *de novo* o la hidrólisis de la esfingomielina. La ceramida actúa regulando principalmente fosfatasa como PP1 o PP2A implicadas en muchas vías de señalización (AKT, MAPK, PKC...). En cambio, S1P, que es secretado, ejerce su función a través de S1PR, receptores de membrana acoplados a proteína G, aunque también puede actuar intracelularmente, por ejemplo inhibiendo deacetilasas de histonas (289). Los estímulos celulares también pueden alterar enzimas del metabolismo de los esfingolípidos y según su localización en orgánulos celulares pueden modificar la composición y función de los esfingolípidos de diferentes orgánulos (284).

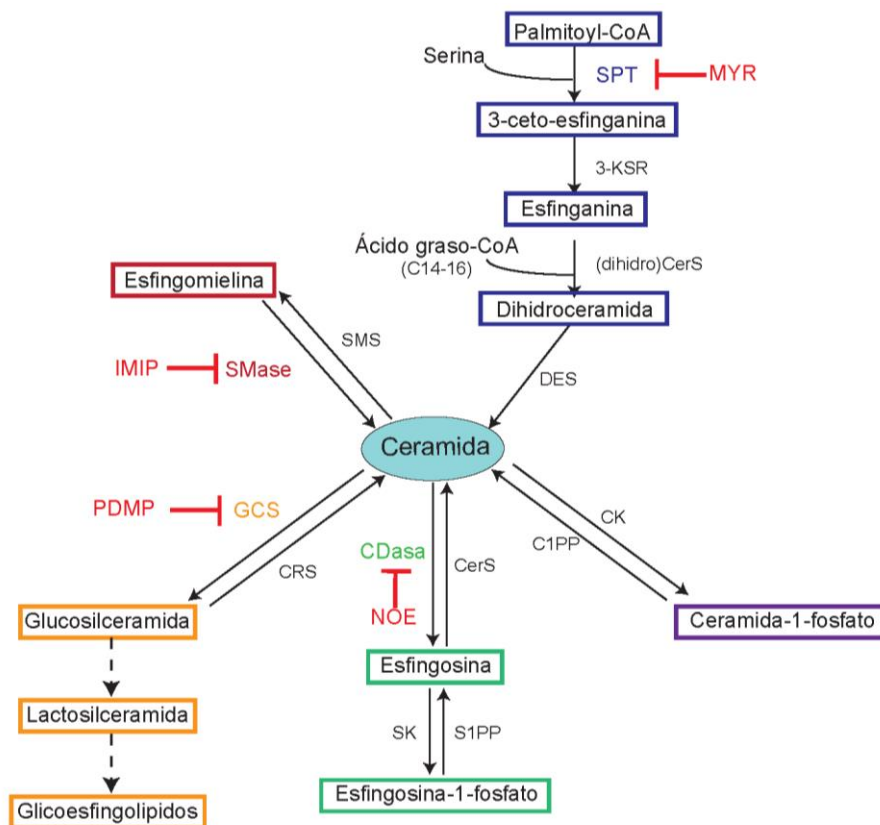


Figura 9: Metabolismo de los esfingolípidos.

Representación de las principales vías implicadas en el metabolismo de ceramidas en hígado. Las ceramidas se generan *de novo* o mediante esfingomielinasas (SMases) a partir de esfingomielina. La ceramida puede modificarse para generar esfingolípidos menos tóxicos como glucosilceramidas, ceramida-1-fosfato o esfingosina-1-fosfato. Inhibidores como NOE, PDMP, imipramina (IMIP) o miriocina (MYR) alteran los diferentes enzimas de esta ruta metabólica cambiando los niveles de esfingolípidos.

6.2.1 Funciones en la membrana celular

Los esfingolípidos ejercen una función muy relevante en las membranas celulares. Existen dominios especializados, con una composición concreta de estas moléculas, como las balsas lipídicas (*lipid rafts*), que regulan la distribución y la actividad de ciertos receptores de membrana y participan en procesos de endocitosis (290). Estudios sobre la SMasa neutra han mostrado que su activación y la consecuente producción de ceramidas favorece la formación de exosomas para la comunicación entre células y su inhibición produce cambios en el contenido de las vesículas (291, 292). Por otro lado, la esfingosina quinasa 1 (SK1) es muy abundante en las terminaciones nerviosas con gran actividad endo y exocítica y su inhibición produce

alteraciones en el reciclaje por endocitosis. La generación de la esfingosina-1-fosfato regularía por lo tanto la formación de endosomas independientemente de su receptor (293). Estos esfingolípidos además de regular la formación de vesículas exosomales y endosomales han sido implicados en la fusión de virus envueltos como el VIH (294).

6.2.2 *Respuesta inmunitaria*

Los esfingolípidos tienen unas funciones relevantes en el sistema inmune como la migración de linfocitos o la regulación de la producción de prostaglandinas por ciclooxigenasa 2 (COX2). Durante la respuesta inmunitaria, S1P es secretado y liberado en sangre por células endoteliales y hematopoyéticas creando un gradiente que promueve, a través del receptor S1PR, la salida de linfocitos de los tejidos linfáticos (295, 296).

6.2.3 *Migración celular*

Otra función de los esfingolípidos es la participación en movilidad celular. En respuesta a estímulos como factores de crecimiento, la síntesis de S1P induce la formación de proyecciones citoplasmáticas favoreciendo la migración celular mediante la fosforilación de proteínas de la familia ERM, responsables de la interacción entre citoesqueleto y membrana (297). Además, el gen SPNS2, relacionado con el transporte de S1P, ha sido identificado recientemente como promotor de la metástasis en modelos animales (298), reafirmando su función en migración e invasión.

6.2.4 *Proliferación y senescencia*

Otro proceso celular en el que participan las ceramidas es la senescencia, limitando la capacidad proliferativa de las células. La primera observación se realizó en fibroblastos humanos que al entrar en senescencia aumentan los niveles de ceramida que inhiben la síntesis de ADN y activan proteínas relacionadas con la senescencia (299). Además, las ceramidas también reducirían la proliferación celular inhibiendo la actividad de las telomerasas (300); y producen la detención del ciclo celular mediante la desfosforilación de la proteína Rb y la inhibición de ciclinas (301, 302).

En cambio, la S1P tiene propiedades proliferativas y se considera un lípido prosupervivencia por su señalización autocrina o paracrina a través del receptor S1PR. Esta función se ha relacionado con procesos oncogénicos en muchos estudios y la sobreexpresión de SK1 y por tanto, el aumento de S1P, induce la transformación maligna y el crecimiento tumoral (303).

6.2.5 *Autofagia*

Los esfingolípidos también están implicados en procesos de autofagia ya sea para inducir la muerte celular o como mecanismo de protección. Por un lado, se ha descrito que un aumento de ceramidas en células tumorales, mediante la administración de ceramidas exógenas o inhibiendo enzimas de su metabolismo, induce la muerte celular por autofagia tras la inhibición de la señalización AKT/mTOR (304). Además la inducción exógena de ceramidas induce un aumento de la proteína autofágica Beclin1 y provoca, mediante la señalización JNK, su disociación con BCL-2 promoviendo la autofagia (305). Por otro lado, se ha descrito que tras un aumento de ceramidas, la inhibición de la autofagia, mediante el inhibidor 3-MA, induce apoptosis en células tumorales por lo que estos esfingolípidos participarían también en la autofagia como mecanismo de supervivencia (306).

6.2.6 *Muerte celular*

Una de las funciones más estudiadas es la implicación de los esfingolípidos, especialmente las ceramidas, en la muerte celular. El primer indicador de esta función es la activación de la SMasa ácida por receptores de muerte como TRAIL o FAS. De este modo, se incrementa la ceramida en la membrana plasmática formando dominios

ricos en ceramida que promueven la señalización apoptótica (307). Además, la señalización de TNF aumenta los niveles de ceramida en la membrana mitocondrial disminuyendo la actividad de la cadena respiratoria y aumentando la producción de ROS y la peroxidación lipídica (308). De hecho, niveles bajos de ceramida inducen resistencia a la apoptosis inducida por estos receptores en células tumorales (309).

Asimismo, las ceramidas también se han relacionado con la vía intrínseca de la apoptosis. Por ejemplo, se ha observado que la inducción de SMasa activa BAX e induce MOMP (310) e incluso las propias ceramidas pueden formar canales en las membranas mitocondriales (311). También se ha descrito que la apoptosis por TNF depende parcialmente de la actividad de SMasa ácida que en los lisosomas induce la actividad de catepsina B, que escinde BID (312).

Por último, la conversión de esta ceramida a S1P anula la apoptosis inducida por ceramida de manera independiente al receptor S1PR, por lo tanto el balance entre ceramida y S1P determina la supervivencia de la célula (313).

1.3 Esfingolípidos y cáncer

Los esfingolípidos han sido estudiados en distintos contextos patológicos como trastornos neurológicos, síndrome metabólico o fibrosis hepática (314) pero sobre todo en procesos oncogénicos por su relación con la supervivencia y la muerte celular (315).

6.2.7 *Metabolismo esfingolipídico en cáncer*

En general, mientras que la ceramida actuaría como supresora de tumores provocando apoptosis o deteniendo el ciclo celular, la S1P es promotora de tumores induciendo proliferación celular, invasión, inflamación y angiogénesis.

La S1P favorece la proliferación y el crecimiento tumoral en múltiples tumores como leucemias, glioblastoma o carcinoma renal (316). Además, la activación de COX2 por SP1 y la consecuente producción de prostaglandinas parece ser relevante en el cáncer de colon asociado a colitis. De hecho, SK1 está sobreexpresada en cáncer de colon y correlaciona con una mayor expresión de COX2 y con estadios avanzados (317). En cambio, los niveles de ceramida están disminuidos en cáncer de colon y en modelos animales deficientes en ceramidasa neutra (NCDasa), el aumento de estos niveles protege del desarrollo de cáncer (318).

La sobreexpresión de ceramidasa ácida (ACDasa) se relaciona con estadios avanzados de melanoma, cáncer de próstata y cáncer de cabeza y cuello. En el caso de melanoma, la sobreexpresión de ACDasa correlaciona con tumores más agresivos en contraste de la expresión de ASMasa que se observa en estadios iniciales, indicando una relación entre bajos niveles de ceramida y estadios avanzados (319).

Finalmente, los esfingolípidos también regulan la angiogénesis en cáncer. S1P promueve la formación de vasos sanguíneos mediante la proliferación de las células endoteliales y la interacción con la señalización de VEGF (320). Además, S1P también induce neovascularización a través del aumento de movilidad de las células endoteliales a través de las proteínas RHO y la remodelación del citoesqueleto (321).

6.2.8 *Implicaciones en terapia*

Muchos agentes quimioterapéuticos inducen cambios en el metabolismo de esfingolípidos, favoreciendo la muerte celular. Algunos como la daunorubicina o gemcitabina, inducen enzimas de la síntesis de *ново* activando la producción de las ceramidas (322). De esta manera se genera citotoxicidad y se induce apoptosis en las células tumorales. En contraste, otros quimioterapéuticos inducen la actividad SMasa produciendo ceramidas

mediante la hidrólisis de la esfingomielina (323). Se ha descrito también que algunos agentes como la actinomicina D o etopósido inducen la producción de ROS, mediante procesos dependientes de p53, que activa NSMasa y la producción de ceramidas (324).

Por otro lado, los esfingolípidos también han manifestado tener un valor predictivo. Por ejemplo, los niveles altos de ceramida en plasma predicen la respuesta a la radiación en tumores metastásicos (325) y la expresión de CerS6 se ha propuesto como marcador de supervivencia en cáncer de colon (326).

No obstante, la evasión de la apoptosis es una característica de las células tumorales y la resistencia a la quimioterapia se ha relacionado con menos acumulación de ceramidas. En muchas ocasiones, la desregulación de enzimas como la GCS, la CDasa o SK1, provoca la derivación de la ceramida a metabolitos no apoptóticos, atenuando los efectos de la terapia y produciendo resistencia. Por ejemplo, el aumento de la actividad GCS se ha asociado a la resistencia en muchos tipos de cáncer como leucemias, melanoma o neuroblastoma (327). En el caso de la GCS, parece existir una conexión con un transportador de la familia ABC, la glicoproteína P (o MDR1). Este transportador está implicado en la translocación de la glucosilceramida en la membrana del aparato de Golgi y contribuye al aumento de la actividad de GCS y la aparición de resistencia (328).

Por ello, se ha estudiado la inhibición de estos enzimas relacionados con el procesamiento de la ceramida. En células de hepatocarcinoma, el silenciamiento de CDasa para inhibir la formación de S1P sensibiliza las células al tratamiento con daunorubicina y reduce el crecimiento de tumores xenógrafos (329). Por otro lado, se ha demostrado que la sobreexpresión de GCS, genera resistencia a la doxorubicina en línea celular de cáncer de mama mientras que en células resistentes a múltiples fármacos, su inhibición revierte la resistencia (330).

Estos conocimientos han conducido al desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas para incrementar los niveles de ceramida y promover la muerte celular de las células tumorales. Una de estas estrategias es el uso de análogos de ceramida o la administración de ceramidas en liposomas para aumentar la eficacia de entrada en la célula, que se ha probado eficazmente en estudios preclínicos de cáncer de mama y otros tumores (331-333). El potencial terapéutico de la inhibición de la SK1, mediante dimetilefingosina, para reducir los niveles de S1P también ha resultado eficaz en el tratamiento de leucemias o cáncer de colon (334). El uso de inhibidores de la ACDasa induce apoptosis y reduce el crecimiento de tumores xenógrafos de cáncer de colon y han resultado eficientes en la sensibilización a quimioterapia (335, 336). Finalmente, la inhibición de la GCS mediante inhibidores como PDMP (1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol) o como el OGT2378, induce apoptosis en múltiples tipos de células tumorales e inhibe el crecimiento tumoral en modelos preclínicos sólo o en sinergia con otros quimioterapéuticos (337, 338).

7 Familia de proteínas Bcl-2

7.1 Estructura y función

La familia de proteínas Bcl-2 es un conjunto de proteínas pro y antiapoptóticas responsables de la regulación de la apoptosis. La proteína BCL-2 fue descubierta en linfomas malignos en los años 90 como oncogén e inductora de supervivencia (339, 340). Su papel en la prevención de la apoptosis dio lugar a la identificación de otras proteínas estructuralmente parecidas que interactuaban entre ellas y forman la familia Bcl-2 (341-344).

Estas proteínas, aproximadamente 20 en mamíferos, contienen regiones muy conservadas de menos de 20 aminoácidos llamados BH (Bcl-2 *homology*) que permiten las interacciones entre las proteínas de la familia. Existen cuatro dominios BH (BH1, BH2, BH3 y BH4) que permiten la clasificación de las proteínas de la familia en tres grupos: las proteínas antiapoptóticas, las proapoptóticas multidominio y las proapoptóticas BH3. Las

antiapoptóticas, previenen la apoptosis y están compuestas por BCL-2, BCL-XI, BCL-w, MCL1, BFL1/A-1, y BCL-B. Las proapoptóticas multidominio incluyen BAX, BAK, y BOK, y no contienen el dominio BH4 mientras que las proapoptóticas BH3 como BIM, BAD, PUMA, NOXA y BID, sólo contienen el dominio BH3 (Figura 10). Generalmente, los dominios BH1, BH2 y BH3 forman una cavidad hidrofóbica compuesta por 9 hélices α que permite la interacción con otro dominio BH3 a través de una hélice α anfipática (345, 346); por lo que las proteínas BH3 pueden unirse a las proteínas multidominio ya sean pro o antiapoptóticas (347). En el caso de BID, la proteína debe ser truncada para exponer el dominio BH3 y poder interaccionar con las otras proteínas (348).

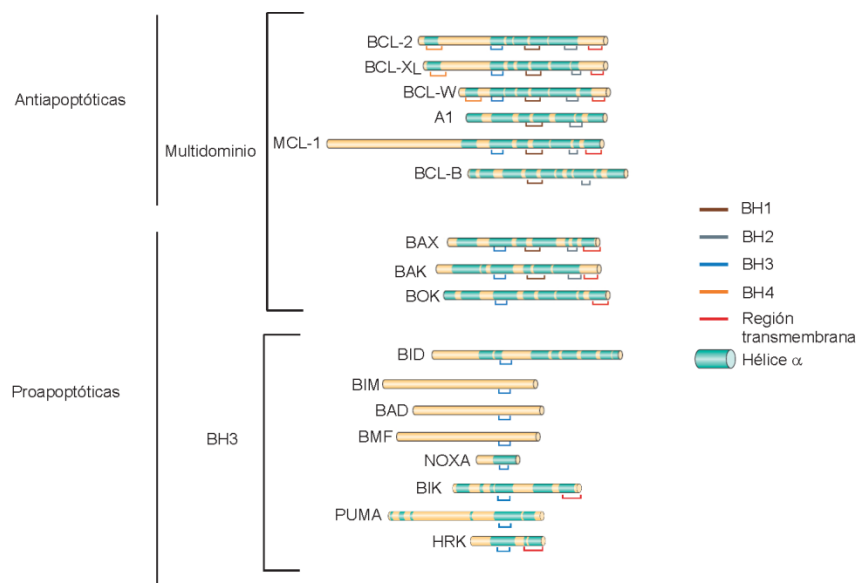


Figura 10: Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2.

La estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 se basa en los dominios BH. Las proteínas antiapoptóticas que contienen mayoritariamente los 4 dominios BH, se unen a proteínas proapoptóticas que pueden tener tres dominios BH o sólo contener BH3. Figura modificada de Youle et al. 2008 (276).

Estas proteínas no se unen indiscriminadamente: las diferencias en la secuencia de los dominios resulta en afinidades diferentes entre proteínas. Así pues, mediante estudios de interacción, se ha observado que BIM, PUMA, y BID son capaces de unirse a todas las proteínas proapoptóticas mientras que NOXA y BAD sólo interaccionan con unas pocas (349). Por otro lado, Bax no interacciona con BCL-2 pero sí con BCL-X_L o MCL-1 (350) (Figura 11).

Las interacciones entre estas proteínas regulan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) induciendo o previniendo la apoptosis. En condiciones normales, las proteínas antiapoptóticas se unen a las proapoptóticas y preservan la integridad de la mitocondria (351). En respuesta a estímulos como el estrés celular o daño genómico, las proapoptóticas BH3 aumentan su expresión y se induce la oligomerización de BAX y BAK que se integran en la membrana mitocondrial iniciando la permeabilización mitocondrial, la liberación de proteínas al citosol y la activación de las caspasas (348, 352). Dos mecanismos parecen inducir este proceso. En la activación indirecta, las proteínas BH3 se unen a las antiapoptóticas liberando BAX y BAK (353). Por ello, las proteínas BH3 que interaccionan con más proteínas como BIM o BID, ejercen una mayor actividad apoptótica, sugiriendo una muerte más potente cuanto más proteínas antiapoptóticas se neutralizan (349). En cambio, en la activación directa, algunas de las proteínas proapoptóticas BH3, principalmente BIM y BID, son capaces de unirse a BAX y BAK e inducir cambios conformacionales que activan la formación de oligómeros (354-357). La unión de proteínas activadoras no parece casual; BIM activa preferentemente a BAX mientras que BID tiene

preferencia por BAK (358). El resto de proteínas BH3, denominadas sensibilizadoras, se encargan de secuestrar las proteínas antiapoptóticas liberando así más proteínas activadoras (359, 360).

Hay que tener en cuenta que las células del organismo presentan una expresión diferencial de las proteínas de la familia Bcl-2. Mientras que BAX y BAK son indispensables para el inicio de la MOMP y la deficiencia de ambas produce resistencia a múltiples estímulos apoptóticos (361), algunas células dependen de alguna proteína antiapoptótica. Por ejemplo, la expresión de BCL-X_L es imprescindible para plaquetas y eritrocitos (362) mientras que se requiere BCL-2 para la supervivencia de linfocitos circulantes (363).

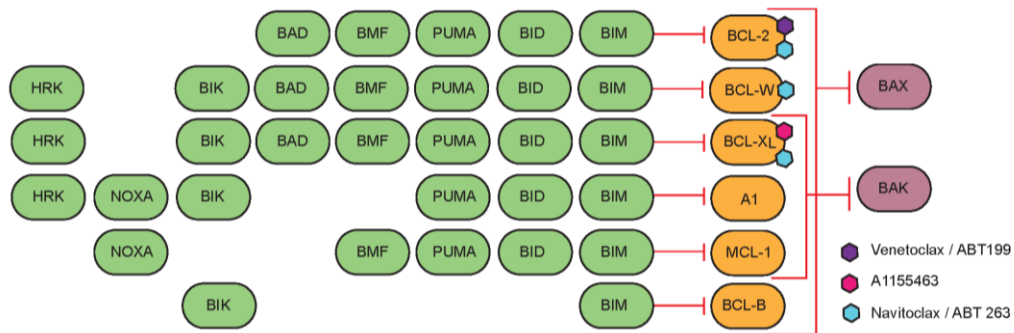


Figura 11: Interacción entre proteínas de la familia Bcl-2.

Las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 son específicas determinando la función de éstas. Por otro lado los miméticos de BH3, como venetoclax, navitoclax o A1155463 inhiben diferentes proteínas antiapoptóticas.

7.2 La familia de proteínas Bcl-2 en cáncer

Las interacciones entre las proteínas de la familia Bcl-2 determinan si la célula inicia o detiene la apoptosis por lo que un desequilibrio entre pro y antiapoptóticas puede afectar el proceso apoptótico. Por ello, estas proteínas están implicadas en múltiples patologías y especialmente en cáncer donde la resistencia a apoptosis es una de las características principales (364, 365).

Un desequilibrio entre las proteínas pro y antiapoptóticas puede favorecer la supervivencia de las células en la transformación oncogénica y en el desarrollo de tumores. De hecho, el gen de BCL-2 fue identificado en la translocación entre el cromosoma 14 y el 18 muy común en linfomas foliculares que produce una proteína de fusión entre una inmunoglobulina y BCL-2 induciendo la supervivencia de las células (340). La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas como BCL-2 o MCL-1 son muy comunes en leucemias (366, 367) y glioblastomas (368) y se han observado también en carcinoma escamoso oral o cáncer de próstata (369, 370). Las proteínas proapoptóticas tienen función supresora de tumores y su expresión está alterada en algunos tumores, como por ejemplo en cáncer colorectal donde el gen de BAX se encuentra frecuentemente mutado (371). Además, p53 regula la expresión de PUMA y NOXA, y su inactivación en muchos tumores sólidos desregula estas proteínas favoreciendo la progresión tumoral (372).

Por otro lado, la desregulación de la apoptosis puede contribuir a la resistencia a fármacos quimioterapéuticos (373). La sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas se ha asociado en muchas ocasiones a un peor pronóstico y a una respuesta ineficaz a fármacos antitumorales (366, 374, 375). Además muchas células tumorales adquieren resistencia a diversos quimioterapéuticos y evaden la apoptosis alterando el patrón de expresión de estas proteínas (376, 377).

En cuanto al CHC, en muestras humanas los niveles de BCL-X_L y de MCL-1 se observan aumentados (378, 379) mientras que los niveles de BAD están disminuidos (380) en tumores respecto a tejido no tumoral adyacente.

Además, algunos microRNAs, como miR34a o miR-573 que controlan la expresión de BCL-2 y BCL-2A1 respectivamente, están disminuidos en algunos pacientes de CHC alterando el patrón de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 (381, 382). Además, estas proteínas antiapoptóticas se han asociado también a resistencia en CHC a doxorubicina y 5-fluorouracilo (383, 384).

7.3 Bcl-2 y estrategia terapéutica

7.3.1 Adicción a Bcl-2

La mayoría de los agentes terapéuticos empleados en cáncer inducen daño y estrés celular (producción de ROS, hipoxia...) que favorece la apoptosis por la vía mitocondrial. Estudios reciente sugieren que una de las razones por la que estos tratamientos no presentan un efecto tóxico en la mayoría de tejidos sanos es que estos apenas expresan las proteínas reguladoras de la apoptosis. La expresión de la familia de Bcl-2 y de algunas caspasas es casi indetectable en cerebro, corazón, riñón, hígado o pulmones de organismos adultos, por lo que estos tejidos no responden a estímulos inductores de apoptosis intrínseca, en contraste con los tejidos hematopoyéticos e intestinales que presentan mayores niveles de proteínas Bcl-2 (385). Estos resultados encajarían con el concepto establecido en los últimos años (*prime to death*, en inglés) que establece que las células tumorales devienen dependientes de señales de supervivencia por lo que son más susceptibles a muerte mitocondrial (386).

Durante la transformación oncogénica, se sobreexpresan en muchas ocasiones proteínas BH3 como BIM provocando un aumento de las antiapoptóticas para contrarrestarlas. Estas alteraciones en células tumorales pueden predisponer a la apoptosis inducida por fármacos debido a la dependencia de estas proteínas antiapoptóticas. Por eso, no resulta extraño que células tumorales con altos niveles de BCL-2 inicien apoptosis tras el tratamiento con quimioterapéuticos. De hecho, esta sensibilización a apoptosis se asocia a una respuesta eficaz a la terapia en pacientes mientras que no se hallaría en tumores resistentes a fármacos (387). Incluso se han identificado, en algunos tipos de cáncer, patrones de expresión de las proteínas de la familia Bcl-2 que predicen la susceptibilidad o resistencia a la terapia (388, 389).

Por otro lado, el laboratorio del Dr. Letai ha desarrollado una técnica llamada "*BH3 profiling*" que consiste en analizar la permeabilidad de la membrana mitocondrial tras la incubación con péptidos de las proteínas proapoptóticas BH3 y permite determinar la dependencia de las células tumorales a una o varias proteínas antiapoptóticas. La inhibición de esta dependencia, que varía según el tumor, permitiría potenciar la sensibilización a apoptosis mejorando la respuesta terapéutica en tumores no respondedores o que han adquirido resistencia (390).

7.3.2 Miméticos de BH3

La familia de proteínas Bcl-2 y la inducción de la apoptosis han sido objeto de estudio durante años en cáncer, especialmente en neoplasias hematológicas, y se han considerado buenas dianas terapéuticas. Diferentes estrategias terapéuticas se han llevado a cabo para inhibir las proteínas antiapoptóticas en tumores (391). Los primeros ensayos clínicos basados en esta estrategia consistían en el uso de ARN de interferencia contra BCL-2 en leucemias linfocíticas crónicas (LLC) que demostró aumentar la supervivencia de los pacientes (392). Con esta aplicación clínica, las compañías farmacéuticas han hecho avances desarrollando pequeñas moléculas inhibitoras que se unen a la cavidad hidrofóbica de las proteínas antiapoptóticas en lugar de las proteínas BH3. Estas moléculas, conocidas como miméticos de BH3, promueven la apoptosis a través de la oligomerización de BAX y BAK, la inducción de MOMP y la liberación de citocromo-c, y mientras algunos miméticos se están evaluando en ensayos clínicos otros ya han sido aprobados para el tratamiento antitumoral.

El ABT-263 (Navitoclax) fue el primer mimético que se probó en ensayos clínicos. Esta molécula, parecida a su antecesor ABT-737 pero con biodisponibilidad oral, inhibe las proteínas antiapoptóticas BCL-2 ($K_i \leq 1$ nM), BCL-X_L ($K_i \leq 0.5$ nM) y BCL-w ($K_i \leq 1$ nM), pero no MCL-1 (393). En ensayos preclínicos, se ha descrito su capacidad antineoplásica en diversos tipos celulares como el carcinoma pulmonar de célula pequeña, mieloma múltiple o linfomas (393, 394). En ensayos clínicos iniciales, el navitoclax mostró buena tolerancia y buen potencial antitumoral en pacientes con LLC y carcinoma pulmonar de célula pequeña. Uno de los principales efectos adversos de este inhibidor, que limita su dosis, es la trombocitopenia debido al requerimiento de BCL-X_L para la supervivencia de las plaquetas (395, 396). Además, se ha observado que en algunas células el navitoclax produce un aumento de los niveles de MCL-1, que puede inducir resistencia al tratamiento (397). Por ello, en algunos tumores se están probando terapias del ABT-263 combinadas con otros quimioterapéuticos (398).

Por otro lado, el venetoclax (ABT-199) es el primer mimético de BH3 aprobado para la práctica clínica que ha revolucionado el tratamiento de leucemias. En estos ensayos con pacientes con LLC recurrente o refractaria, el 20% tuvieron una remisión completa mientras que el 79% respondían eficazmente al tratamiento (399). Su éxito en ensayos clínicos de fase 1 y 2 (399, 400) aceleró su aprobación por parte de las agencias médicas para poder tratar a pacientes que no respondían a las terapias establecidas (401). De administración oral, el venetoclax es un inhibidor específico de BCL-2 ($K_i < 0.01$ nM) de manera que su administración no produce trombocitopenia aunque suele inducir neutropenia. Otras neoplasias hematológicas, como la leucemia mieloide aguda, han mostrado menor respuesta al venetoclax probablemente debido a una mayor dependencia de BCL-X_L o MCL-1 (402). Estudios preclínicos vaticinan buenos resultados de la combinación del venetoclax con otros fármacos (403, 404) y actualmente se están llevando a cabo decenas de ensayos clínicos con este inhibidor aunque centrados únicamente en tumores hematopoyéticos (405).

Por otro lado, también se han desarrollado miméticos de BCL-X_L (WEHI-539, A-1331852 y A-1155463), capaces de inducir apoptosis en células deficientes de MCL-1 a pesar de ser esencial para la supervivencia de las plaquetas (406). El inhibidor A-1331852 ($K_i < 0.01$ nM) es el único con biodisponibilidad oral y su administración induce una trombocitopenia transitoria en ratones, recuperando el número de plaquetas normal a las 72 horas y reduce el crecimiento tumoral en modelos xenógrafos de carcinoma pulmonar de células pequeñas (407).

El auge de los miméticos ha estimulado el desarrollo de nuevos inhibidores más específicos. Para combatir el aumento de MCL-1 en tumores resistentes a miméticos u otros fármacos se han sintetizado inhibidores de MCL-1 aunque poco específicos. Entre estos inhibidores, destacan S63845 y AMG 176 que han inducido apoptosis eficazmente en múltiples líneas celulares y modelos xenógrafos de linfomas y mielomas así como en tumores sólidos en combinación con otras terapias (408, 409). Hasta el momento, no existen inhibidores de BCL-w, BCL-B o BFL-1/A1, aunque probablemente estas proteínas resalten en futuras investigaciones acerca de cáncer y resistencia a quimioterapia.

Objetivos

Las enfermedades hepáticas crónicas representan un problema mundial de salud y el aumento de su prevalencia viene acompañado de un mayor riesgo de CHC. Además la dificultad del diagnóstico y la falta de tratamientos definitivos resaltan la necesidad de la investigación de estos procesos patológicos. Con este propósito, el objetivo general de esta tesis es identificar y validar dianas terapéuticas en fibrosis y cáncer hepático.

La fibrosis hepática y la inflamación son características muy importantes en la esteatohepatitis no-alcohólica. De hecho, un grado elevado de fibrosis se correlaciona con un peor pronóstico en pacientes con EHNA. La activación de la célula hepática estrellada es el proceso clave para el inicio y la progresión de la fibrosis y dado el papel de AXL en esta activación el primer objetivo se centra en analizar su papel en la patogénesis del EHNA.

Objetivo 1: Determinar el papel de AXL en la fibrosis inducida en EHNA y validar su potencial como marcador de fibrosis hepática.

El sorafenib era hasta hace poco el único tratamiento efectivo para pacientes con CHC avanzado pero la aparición de resistencia y la recurrencia tumoral es su principal inconveniente. Además con la aprobación de nuevos tratamientos, es interesante analizar las alteraciones en respuesta a sorafenib para la identificación de marcadores de eficacia o resistencia. En este proyecto se pretende estudiar mecanismos de acción del sorafenib y encontrar nuevas dianas terapéuticas que permitan sensibilizar farmacológicamente a sorafenib a las células tumorales. Tanto el metabolismo de los esfingolípidos como las proteínas de la familia Bcl-2 están relacionadas con la integridad de la mitocondria y la muerte celular; y se encuentran alteradas en cáncer o en respuesta a quimioterapéuticos, pero su regulación por parte del sorafenib ha sido poco estudiada.

Objetivo 2: Análisis de cambios en el perfil esfingolípido tras tratamiento con sorafenib y evaluación del mecanismo de acción de la inhibición farmacológica de la GCS en hepatocarcinoma.

Objetivo 3: Caracterización de alteraciones mitocondriales y de proteínas de la familia Bcl-2 en tratamiento con sorafenib en carcinoma hepatocelular y su aplicación terapéutica.

Materiales y métodos

1. Reactivos

Reactivo	Referencia	Casa comercial
Hematoxilina de harris	HHS32	Sigma-Aldrich
Eosina	HT110132	Sigma-Aldrich
Formalina	HT501128	Sigma-Aldrich
Direct Red 80	365548	Sigma-Aldrich
1.3% picric acid solution in H ₂ O	P6744	Sigma-Aldrich
DAB	11718096001	Roche
Suero de cabra	X0907	DAKO
Hematoxilina DAKO	CS700	DAKO
Agua oxigenada	H1009	Sigma-Aldrich
Aquatex	108562	Merck Millipore
TRIzol™ Reagent	15596018	Invitrogen
Agua sin RNasas	W4502	Sigma-Aldrich
Solución de tripsina-EDTA	T4049	Sigma-Aldrich
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	D6429	Sigma-Aldrich
Medio RPMI-1640	R8758	Sigma-Aldrich
PBS estéril	D8662	Sigma-Aldrich
Penicilina-Estreptomcina	P4333	Sigma-Aldrich
Suero Bovino Fetal (FBS)	10270106	Gibco
Medio de montaje DPX	06522	Sigma-Aldrich
MTT	M2128	Sigma-Aldrich
Liver cancer (SAB Target List) H383	#10034526	BioRad
Fibrosis (SAB Target List) H384	# 10034493	BioRad
TissueScan™ Liver Cancer cDNA Array I	LVRT101	Origene
RIPA	R0278	Sigma-Aldrich
cComplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	11873580001	Roche
Bradford	#5000205	BioRad
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	A3699	Sigma-Aldrich
TRIZMA	T1503	Sigma-Aldrich
TRIS-HCl	T5941	Sigma-Aldrich
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	62862	Sigma-Aldrich
TEMED	sc-29111	Santa Cruz Biotech
APS	A3678	Sigma-Aldrich
Tampón de carga Laemmli 2X	#1610737	BioRad
Buffer 10x Tris/Glycine/SDS	#1610732	BioRad
Marcador de peso molecular Novex sharp	LC5800	Invitrogen
Ponceau	P7170	Sigma-Aldrich
TBS-T	T9039	Sigma-Aldrich
ECL PIERCE	32106	Thermo-Scientific
CHAPS	C9426	Sigma-Aldrich
medio ProLong™ Gold Antifade Mountant	P10144	Life technologies
In Situ Cell Death Detection Kit	11 684 817 910	Roche
Hepes	H3375	Sigma-Aldrich
Hidroxiprolina	H54409	Sigma-Aldrich
Cloramina T	857319	Sigma-Aldrich
Ácido cítrico	C-1909	Sigma-Aldrich
HCl	H1758	Sigma-Aldrich
4-Dimetilaminobenzaldehído	109762	Sigma-Aldrich
ácido perclórico	244252	Sigma-Aldrich
acetato sódico	320099	Sigma-Aldrich
NAOH	30620	Sigma-Aldrich
PMA	P8139	Sigma-Aldrich
Cristal violeta	sc-207460	Santa Cruz Biotech
Lipofectamina 2000	11668	Life technologies
Opti-MEM™	31985062	Invitrogen
Quick extract solution	QE09050	Epicentre
Human AXL DuoSet ELISA	DY154	R&D Systems
Human GAS6 DuoSet ELISA	DY885B	R&D Systems
Human MERTK DuoSet ELISA	DY6488	R&D Systems
Mouse AXL DuoSet ELISA	DY854	R&D Systems
Mouse GAS6 DuoSet ELISA	DY986	R&D Systems
Mouse MERTK DuoSet ELISA	DY591	R&D Systems
ELISA IL1β	900-TM95	Peptotech
ELISA MCP1	900-TM31	Peptotech
iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708890	BioRad
iTaq Universal SYBR Green	1725120	BioRad
ADP/ATP Ratio Assay Kit	MAK135	Sigma
Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit	ab109720	Abcam
GAPDH Activity Assay Kit	#K680- 100	Biovision
3 Methyladenine (3-MA)	sc-205596	Santa Cruz Biotech
Sorafenib		Bayer
Regorafenib		Bayer
PDMP	sc-203030	Santa Cruz Biotech

HA14-1	sc-205911	Santa Cruz Biotech
Imipramine	I0899	Sigma
Myriocine	BML-SL226-0005	Enzo Life Sciences
HA14-1	S1071	Selleckchem
ABT 737	S1002	Selleckchem
ABT 263	S1001	Selleckchem
AT 101	S2812	Selleckchem
Ac DEVD-AFC	sc-311274A	Santa Cruz Biotech
H2DCFDA	D6883	Sigma
Hoechst 33258	B2883	Sigma-Aldrich
Cremophor® EL	C5135	Sigma-Aldrich
Tween80	P1754	Sigma-Aldrich
Tween20	P1379	Sigma-Aldrich
Z-VAD-FMK	sc-3067	Santa Cruz Biotech
JC-1	T3168	Life technologies

2. Cultivos celulares

Las líneas celulares de hepatoma Hep3B, HepG2 y PLC/PRF5 así como la línea de monocitos humana THP1 y la de macrófagos de ratón RAW264.7 fueron obtenidas del ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures). La línea celular de CEH, LX2, fue cedida por el Dr. Ramón Bataller y las células de hepatocarcinoma BCLC-9 fueron cedidas por el Dr. Jordi Bruix. Las líneas celulares se mantuvieron en incubadores Nirco con una atmósfera humidificada a 37°C y 5% de CO₂. La mayoría de células se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) que contiene 4500 mg/L glucosa, L-glutamina, piruvato sódico y bicarbonato sódico, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) previamente inactivado por calor y antibióticos (100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina). Las THP1 se mantuvieron en medio RPMI 10% FBS y 100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomina y antes de su uso fueron activadas con 100ng/ml de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) durante 3 días para estimular su diferenciación a macrófagos.

En condiciones estériles, las células fueron tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,25%), contadas en la cámara de Neubauer y sembradas en placas de cultivos según el experimento. Posteriormente fueron tratadas toda la noche o menos tiempo con diferentes productos como se indica en cada caso.

3. Ensayos de viabilidad y clonogénicos

El método MTT determina la viabilidad celular mediante la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) por enzimas oxidoreductasas de la mitocondria en células viables. Esta reacción produce un compuesto insoluble en agua de color púrpura (formazan), que puede ser disuelto posteriormente en disolventes orgánicos como el 1-propanol. Para esta técnica se siguió el siguiente protocolo:

-Se siembran entre 7500 y 10000 células de hepatoma en 100µl de medio por pocillo en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, se tratan con diferentes fármacos.

-Tras el tiempo estipulado para el tratamiento, se añaden 10µl por pocillo de una solución de 5mg/ml de MTT en PBS y se incuba la placa dos horas a 37°C.

-Se retira con cuidado todo el medio de la placa y se deja secar 10 minutos.

-Se disuelven los cristales en 100µl de 1-propanol por pocillo y se agita para que el color sea homogéneo. Se procede a la lectura de absorbancia a 570 y 630nm y se determina el porcentaje de viabilidad según la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = \frac{(\text{Abs. 570 muestra} - \text{Abs. 630 muestra})}{(\text{Abs. 570 control} - \text{Abs. 630 control})} \times 100$$

Para los ensayos clonogénicos, se siembran 2×10^4 células de hepatoma por pocillo en placa de 12 pocillos y se tratan con los fármacos. A los cuatro días de tratamiento, las células se lavan con PBS y se fijan con formalina 5

minutos. Una vez fijadas, se tiñen con cristal violeta al 0.05% durante 30 minutos en agitación. Finalmente se lavan los pocillos con agua corriente y se dejan secar para fotografiar.

4. Extracción y cuantificación de proteínas

Para la extracción de proteínas, se lisan las células en RIPA (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) en la placa de cultivos (100µl por pocillos de placa de 6). Tras una incubación de 15 minutos en hielo, se centrifuga a 4°C 10 minutos a 12000xg. Se recupera el sobrenadante que se conservará para las posteriores aplicaciones a -20°C.

Se recoge una alícuota del sobrenadante para determinar la cantidad de proteína mediante el método Bradford. Este reactivo contiene Comassie Brilliant Blue G-250 que reacciona con aminoácidos aromáticos y básicos produciendo coloración azul y un cambio en la absorbancia. En una placa de absorbancia se pipetea 5µl de una dilución de las muestras y la recta patrón (BSA desde 0 a 1mg/ml) y 195µl de reactivo. Tras 5 minutos de incubación se lee la placa en el espectrofotómetro a 595nm. A partir de la recta patrón, se estima la concentración proteica de las muestras.

5. Western Blot

Para analizar la expresión proteica, las muestras se cargan en un gel de acrilamida y tras separarlas por peso molecular se transfieren a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el siguiente protocolo:

-Se diluyen 20-30 µg de proteína con tampón de carga Laemmli 2X y se hierven 3 a 5 minutos a 100°C.

-Se preparan los geles para la electroforesis con separadores de 1.5 mm de grosor. Primero, se añade el gel separador cuyo porcentaje depende del peso de las proteínas a analizar y una vez polimerizado, se añade el gel concentrador y el peine para las muestras.

	6%	10%	15%	Gel concentrador
1.5 M Tris pH 8.8	10 ml	10 ml	10 ml	0 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	4.1 ml	6.8 ml	10 ml	1.08 ml
0.5 M Tris-HCl pH 6.8	0 ml	0 ml	0 ml	4.5 ml
SDS 10%	200 µl	200 µl	200 µl	100 µl
Agua MQ	5.9 ml	3.2 ml	0 ml	3.6 ml
Temed	28 µl	28 µl	28 µl	22.5 µl
APS 13%	100 µl	100 µl	100 µl	90 µl

-Cargar las muestras en el gel y en uno de los carriles un marcador de peso molecular, que servirá como guía para visualizar la progresión de la electroforesis.

-Correr en buffer de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicine, 0.1% SDS, pH 8.3) preparado a partir de una solución 10X (BioRad) inicialmente a 80V, hasta sobrepasar el gel concentrador, y después a 100-120V hasta que las muestras lleguen al final del gel.

-La electrotransferencia de gel a membrana de nitrocelulosa se realiza en sistema de transferencia el Trans-Blot® Turbo™ de BioRad siguiendo las instrucciones de uso.

-Una vez se han transferido las proteínas, la membrana se tiñe con Ponceau para comprobar su transferencia y tras lavar con TBS-T (NaCl - 0.138 M; KCl - 0.0027 M; TWEEN® 20 0.05%, pH 8.0) se bloquea la membrana en una solución de 5% de leche o de BSA, en el caso de la detección de proteínas fosforiladas.

-Se incuba con el anticuerpo primario diluido en TBS-T durante 3h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

-Se lava la membrana en TBS-T (3x5min.) y se incuba con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente.

-Después de otra serie de lavados, se revela la membrana por quimioluminiscencia con el reactivo ECL PIERCE en el sistema de imagen VersaDoc™ MP 4000 (Bio-Rad).

Anticuerpo	Referencia	Origen	Peso molecular	Casa comercial
Acid Ceramidase (T-20)	sc28486	goat	43/40/13	Santa Cruz Biotech.
Akt1/2/3 (H-136)	sc8312	rabbit	62/56/62	Santa Cruz Biotech.
BCL-2 (N-19)-HRP	sc492		26	Santa Cruz Biotech.
BCL-X_L (H-5)	sc8392	mouse	30	Santa Cruz Biotech.
BECN1 (H-300)	sc11427	rabbit	60	Santa Cruz Biotech.
BIM (H-191)	sc 11425	rabbit	19/21/24	Santa Cruz Biotech.
Citocromo c (H-104)	sc7159	rabbit	15	Santa Cruz Biotech.
ERK 1/2 (MK1)	sc135900	mouse	44/42	Santa Cruz Biotech.
pERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	sc16982	goat	44/42	Santa Cruz Biotech.
MAP LC3β (H-50)	sc28266	rabbit	15	Santa Cruz Biotech.
MCL-1 (S-19)	sc819	rabbit	40/30	Santa Cruz Biotech.
p-BIM EL (Ser65)	36-004	Rabbit	24	Merck Millipore
p-Akt1/2/3 (Ser 473)-R	sc7985	rabbit	62/56/62	Santa Cruz Biotech.
PARP-1 (H-250)	sc7150	rabbit	116/89	Santa Cruz Biotech.
UGCG Antibody	12869-1-AP	Rabbit	50/55	Proteintech
β-actina-HRP	A3854	goat	42	Sigma -Aldrich
Ratón IgG-HRP	sc2055	goat		Santa Cruz Biotech.
Conejo IgG-HRP	sc2054	goat		Santa Cruz Biotech.

6. Extracción de ARN

Para la extracción de ARN, se homogenizó alrededor de 100mg de tejido o $5 \cdot 10^6$ células en 1ml de TRIzol® (Invitrogen). Durante este procedimiento se trabaja con material esterilizado y libre de ARNasas y todas las centrifugaciones se realizan a 4 °C.

-Se añade 200µl de cloroformo por cada ml de TRIzol®, se mezcla por inversión.

-Tras unos minutos de incubación se centrifuga 15 minutos a 12000xg. El homogenado se separa en 3 capas: capa acuosa superior, que contiene ARN, y en capas orgánica roja y de interfase inferiores, que contienen ADN y proteínas.

-Se recupera la fase acuosa en un nuevo tubo y se añade el mismo volumen de isopropanol.

-Se mezcla por inversión y se incuba 10 minutos. Posteriormente, para precipitar el ARN se centrifuga 10 minutos a 12000xg.

-Para eliminar impurezas, el ARN precipitado se resuspende en 1ml de etanol al 75% y se incuba a -20°C al menos una hora.

-Se vuelve a precipitar el ARN, se retira el sobrenadante y se deja secar el ARN precipitado para eliminar los rastros de etanol.

-Finalmente se resuspende en 30-100µl de agua libre de ARNasa y se congela a -80°C.

7. RT y qPCR

Debido a la inestabilidad del ARN, se retrotranscribe a cADN para su uso en aplicaciones posteriores. Para ello, se cuantifica el ARN utilizando el espectrofotómetro Nanodrop™ (Invitrogen) y se utilizan 1000ng de ARN diluidos en 15µl de agua siguiendo las instrucciones del kit de síntesis de cDNA iScript™ (Biorad). Se añade 1µl

de la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney (M-MLV) y 4µl de supermix que contiene una mezcla de primers oligo(dT) y hexámeros aleatorios entre otros componentes necesarios para la reacción. La transcripción reversa se lleva a cabo en un termociclador siguiendo el siguiente protocolo: 5 minutos a 25°C, 20 minutos a 46°C para la transcripción reversa y 1 minuto a 95°C para la inhibición del enzima. El resultado de la reacción se disuelve en 100µl totales para obtener una concentración de 2.5µg de ARN por µl.

Para el análisis de expresión génica, se realizaron PCR (polymerase chain reaction) cuantitativas mediante la sonda SYBR® Green que emite señal fluorescente en presencia de cadenas dobles de nucleótidos. Se utilizó la supermix *iTaq Universal SYBR Green* (Biorad) que contiene la polimerasa iTaq (con activación rápida mediada por anticuerpos), nucleótidos, el fluorocromo SYBR® Green, MgCl₂ y estabilizadores. Por cada reacción, se pipetearon 10ng de cADN, mix de *primers* específicos para cada gen y el supermix iTaq Universal SYBR Green siguiendo el siguiente protocolo:

	Concentración inicial	Concentración final	Volumen por reacción (µl)	
			96 pocillos	384 pocillos
iTaq Universal SYBR Green	2X	1X	5	3
Agua sin ARNasas			0,4	0,64
Mix de primers 5'+3'	5µM	300nM	0,6	0,36
cADN	2,5µg/µl o 5µg/µl	10ng	4	2
Volumen final			10 µl	6 µl

La señal fluorescente se detectó a tiempo real en sistemas de detección *MyiQ™ Single Color Real Time* (Biorad) para placas de 96 reacciones o *CFX384 Touch System* (Biorad) para placas de 384 reacciones. El programa utilizado fue el siguiente:

1. Activación de la polimerasa: 95°C, 5 minutos
2. 40 ciclos de : Desnaturalización: 95°C, 15 segundos
Annealing y extensión: 60°C, 30 segundos
3. Desnaturalización: 95°C, 1 minutos
4. Curva Melting: 81 ciclos de 10 segundos a 55°C + 0,5°C/ciclo

El análisis se realizó mediante el método de comparativa Ct ($\Delta\Delta C_t$) para obtener la expresión génica relativa respecto a genes control (*housekeeping*: β -actina y 18S). Durante los tres estudios se utilizaron los siguientes *primers*:

Especie	Gen	#	Secuencia 5' → 3'
Ratón	β -Actina	NM_007393	Fw. GACGGCCAGGTCATCACTAT Rv. CGGATGTCAACGTCACTT
Ratón	18S	NR_003278.3	Fw. CGC GGT TCT ATT TTG TTG GT Rv. AGT CGG CAT CGT TTA TGG TC
Ratón	AXL	NM_009465.4	Fw. TGAGCCAACCGTGGAAAGAG Rv. AGGCCACCTTATGCCGATCTA
Ratón	ADAM10	NM_007399.4	Fw. AAGGGATATGCAATGGCTTC Rv. TTGCCCATTAATGCACACTT
Ratón	TACE	NM_009615.6	Fw. CTGGCAGATAACATCGTTGG Rv. GATGCGAACAGATGCTGAGT
Ratón	α -SMA	NM_007392	Fw. ATGGCTCTGGGCTCTGTA AG Rv. CCCATTCCAACCACTACTCC
Ratón	COL1A1	NM_007742	Fw. GAGCGGAGAGTACTGGATCG Rv. GTTCGGGGCTGATGTACCACT
Ratón	MMP9	NM_013599	Fw. CAAATTCTTCTGGCGTGTGA Rv. CGGTTGAAGCAAAGAAGGAG
Ratón	MPO	NM_010824.2	Fw. TGCTGAAGAACCCTGGAGTTG Rv. AAACCGATCACCATCACGTA
Ratón	F4/80	NM_010130.4	Fw. TTTCCCTCGCCTGCTTCTTC Rv. CCCCCTCTCTGTATTCAACC

Ratón	CCR2	NM_009915.2	Fw. ATCCACGGCATACTATCAACATC Rv. CAAGGCTCACCATCATCGTAG
Ratón	IL-6	NM_031168	Fw. CCGGAGAGGAGACTTCACAG Rv. CAGAATTGCCATTGCACAAC
Ratón	MCP-1	NM_011333	Fw. CAAGAAGGAATGGGTCCAGA Rv. GCTGAAGACCTTAGGGCAGA
Ratón	IL-1 β	NM_008361	Fw. TCAGGCAGGCAGTATCACTC Rv. CATGAGTCACAGAGGATGGG
Ratón	TNF	NM_013693	Fw. CTGAACCTTCGGGGTGATCGGT Rv. ACGTGGGCTACAGGCTTGTC
Humano	β -Actina	NM_001101	Fw. GGAAGGCAAGAGATGG Rv. AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG
Humano	RPII	NM_000937.4	Fw. GACACAGGACCACTCATGAAGT Rv. TCTTGTACTGGCGTGGATT
Humano	18S	NM_022551.2	Fw. CCGAAGATATGCTCATGTGG Rv. GTGCGGCTGCTTCCATAAG
Humano	CDasa	NM_004315	Fw. CTACCCAAGTCTCAGCGCGCTT Rv. GCACCTCTGTACGTTGGTCTGAA
Humano	GCS	NM_003358	Fw. GCCTTGGAGGGAATGGCCGTC Rv. GAGAGACACCTGGGAGCTTGCTA
Humano	ASMasa	NM_181746	Fw. GTCTCCGCCTCATCTCTCTC Rv. GCACTTTGTCTCTCGATCC
Humano	CERS2	NM_181746	Fw. ACCCGAGCAGACGGAGTACACGG Rv. ACCCGAGCAGACGGAGTACACGG
Humano	SPT	NM_006415	Fw. CGTGGGGACTTGTGGACCCA Rv. AGCACTGGCTATGGTGGCAAATCC
Humano	SK	NM_021972	Fw. GGGCGCTCCAGTCCCTCAGA Rv. GTCGGTCCGGTTTGCTGGGG
Humano	BCL-2	NM_000633.2	Fw. GGAGGATTGTGGCCTTCTTT Rv. GCCGTACAGTTCCACAAAGG
Humano	BCL-B	NM_020396.3	Fw. GCTGGGATGGCTTTTGTCA Rv. GCCTGGACCAGCTGTTTTCTC
Humano	BCL-W	NM_004050.4	Fw. ACCCCAGGCTCAGCCCAACA Rv. CAGCACACAGTGCAGCCCA
Humano	BCL-XL	NM_138578.2	Fw. GGATGGCCACTTACCTGA Rv. CGGTTGAAGCGTTCCTG
Humano	BFL-1	NM_004049.3	Fw. TTACAGGCTGGCTCAGGACT Rv. AGCACTCTGGACGTTTTGCT
Humano	MCL-1	NM_021960.4	Fw. ATGCTTCGGAACTGGACAT Rv. TCCTGATGCCACCTTCTAGG
Humano	BIM	NM_138621.4	Fw. TGGCAAAGCAACCTTCTGATG Rv. GCAGGCTGCAATTGTCTACCT
Humano	NOXA	NM_021127.2	Fw. TGGAAAGTCGAGTGTGCTACTCAA Rv. CAGAAGAGTTTGGATATCAGATTGAGA
Humano	PUMA	NM_001127240.2	Fw. GCATGCCTGCCTCACCTT Rv. TCACACGTCGCTCTCTCTAAACC
Humano	MCP1	NM_002982	Fw. TCAAAGTGAAGCTCGCACTC Rv. ATTGATTGCATCTGGCTGAG
Humano	COL1A1	NM_000088	Fw. CCTGGATGCCATCAAAGTCT Rv. ACCAGACATGCCTCTTGTCC
Humano	α -SMA	NM_001613	Fw. CCGACCGAATGCAGAAGG Rv. ACAGAGTATTGCGCTCCGGA

8. Transfección siARN y vectores de expresión

Para analizar los efectos del silenciamiento de genes se usaron ARN de interferencia (siARN) que se transfectaron de manera transitoria. La lipofectamina es un lípido catiónico que interacciona con los ácidos nucleicos formando complejos y facilitando la entrada al citoplasma.

En placa de 24 pocillos se siembran alrededor de 9×10^4 células Hep3B o 10×10^4 células HepG2 para tener una confluencia del 70%. Por pocillo de 24, se preparan 50 μ l de Opti-MEM™, un medio específico para transfecciones lipídicas, y la lipofectamina, cuyo volumen varía para cada tipo celular según su toxicidad y su eficacia de transfección (1 μ l para las Hep3B y PLC; y 1.5 μ l para las HepG2). En otro tubo, se prepara por pocillo 50 μ l de Opti-MEM y 20pmols de siARN específico y se mezclan suavemente. Esta solución se incorpora a la de lipofectamina y se incuba a temperatura ambiente 20 minutos a temperatura ambiente. Se añaden estos 100 μ l al pocillo y a

las 6 horas se cambia el medio del pocillo. El silenciamiento óptimo se obtiene a las 48-72 horas y se comprueba mediante qPCR o western blot.

siARN	Referencia	Casa comercial
siBcl2	sc29214	Santa Cruz Biotech.
siMcl1	sc35877	Santa Cruz Biotech.
siBcl-XL	sc43630	Santa Cruz Biotech.
siGCS	sc45404	Santa Cruz Biotech.
siACD	sc105032	Santa Cruz Biotech.

El mismo protocolo se usa para la transfección del vector de DNA LC3-GFP, para expresar LC3 conjugado a GFP, y vectores de expresión de GCS, para sobreexpresar la proteína.

9. Ensayo de cierre de herida (wound healing assay)

Este ensayo permite valorar la capacidad migratoria de las células en diferentes condiciones. Se sembraron células LX2 en placas de 6 pocillos para obtener una confluencia del 90%. Con una punta estéril de micropipeta de 200µl se realiza una cicatriz en la monocapa celular. Se realizan fotografías del mismo campo en un microscopio invertido a tiempo 0 y tras 24 horas de tratamiento con BGB324 o anticuerpo activador de AXL (AF154, R&D). Las fotografías se analizan mediante el software ImageJ y se calcula la longitud de la cicatriz y el porcentaje de cierre de la cicatriz respecto al control.

10. Análisis del potencial de membrana mitocondrial con JC-1

JC-1 es una sonda catiónica que se acumula en la mitocondria dependiendo del potencial de membrana. En condiciones normales, predominan los agregados de JC-1 que emiten fluorescencia roja (em. 535nm, ex. 590nm) sobre los monómeros que emiten fluorescencia verde (em. 485nm, ex. 530nm). La despolarización de la membrana reduce el ratio agregados/monómeros aumentando la fluorescencia verde.

Para determinar el cambio en el potencial de membrana, 5×10^5 células Hep3B en placa de 6 pocillos fueron tratadas y posteriormente se tiñeron con JC-1, a una concentración final de 5µg/ml, durante 15 minutos a 37°C. Después, las células se lavaron con PBS y se procedió a la lectura de las dos fluorescencias en un lector de fluorescencia. Se calcularon los resultados mediante un ratio de agregados (rojo)/monómeros (verde) relativo a la muestra control.

11. Determinación de los niveles de ROS

Para determinar la producción de ROS, se cultivaron 5×10^5 células Hep3B en placa de 6 pocillos. Tras el tratamiento, se incubaron las células con 10µM de diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) en medio DMEM sin fenol durante 30 minutos a 37°C. En presencia de peróxido de hidrogeno, el H₂DCFDA se oxida a 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), emitiendo fluorescencia. Después de los 30min., las células se lavaron con PBS y se leyó la fluorescencia a una excitación de 485nm y una emisión de 520nm. Los resultados se expresan en porcentajes relativos al control.

12. Ensayo de actividad caspasa 3

Este ensayo se basa en la detección de la ruptura del sustrato DEVD-AFC (7 amino-4-trifluorometil coumarin) por parte de la caspasa 3 liberando AFC que emite fluorescencia amarilla-verde (ex. 400nm, em. 505nm).

Para este ensayo, es necesario un buffer de lisis (50mM Hepes, 5mM CHAPS, 5mM DTT, pH 7.4) y un buffer de ensayo (20mM Hepes, 0.1% CHAPS, 2mM EDTA, 5% sucrose, 5mM DTT).

- Las células en pocillos de 6 se lavan con PBS y se lisan en 100µl buffer de lisis.
- Se recoge el homogenado con ayuda de un rascador y se centrifuga 5 min a 10000xg.
- Se recupera el sobrenadante, que puede congelarse, y se prepara una alícuota para cuantificar proteína mediante el método Bradford.
- En una placa de 96 pocillos negra, se preparan 50µg de proteína en un volumen de 50µl y se añade 150µl de buffer de lisis con el sustrato DEVD-AFC a una concentración final de 50 µM.
- Se realiza una lectura cinética en el fluorímetro con una excitación de 400nm y emisión a 505nm cada 15 minutos a 37°C. La actividad de caspasa 3 se determina mediante el incremento de fluorescencia respecto al tiempo y los resultados se expresan respecto al control.

13. Cuantificación de mitocondrias

Para determinar cambios inducidos por los tratamientos en la cantidad de mitocondrias en las células de hepatoma, analizamos el ratio entre ADN mitocondrial (ADNmt) y el ADN nuclear.

Las células en placas de 12 pocillos se lavan con PBS estéril y se lisan en 100µl de la solución de Quick Extract para extraer el ADN total. Se recupera el lisado en un microtubo y se vortea durante 30 segundos. Se incuba 6 minutos a 65°C, se vortea y se incuba a 98°C otros 2 minutos. Finalmente se vortea y centrifuga a 14000xg 2 minutos y se recupera el sobrenadante que contiene el ADN.

Este ADN se diluye 5 veces para realizar una PCR cuantitativa con SYBR Green con *primers* específicos de $\beta 2$ microglobulina como ADN nuclear y de un fragmento del arco menor del genoma mitocondrial. Cambios en el contenido de ADNmt respecto al ADNn indicarían cambios en el número de mitocondrias en la célula.

	GenBank	Primers 5'→ 3'
mtMinArc ADNmt	NC_012920	Fw CTAATAGCCCACACGTTCCC Rv AGAGCTCCCGTGAGTGGTTA
$\beta 2M$	NT_010194.17	Fw GCTGGGTAGCTCTAAACAATGTATTCA Rv CCATGTAATAACAAATGTCTAAAATGGT

14. Hoechst

Hoechst 33258 es un colorante fluorescente que se une al ADN y se excita con luz ultravioleta marcando el núcleo celular. Este producto puede usarse en células y tejidos fijados o vivos y permite detectar fragmentación y condensación nuclear en caso de apoptosis.

Se sembraron 5×10^4 células Hep3B en placas de 12 pocillos y tras 6 horas de tratamiento se tiñeron las células diluyendo 1/1000 un stock de Hoechst de 10 mg/ml y obteniendo una concentración final de 10 µg/ml. Se incubó 30 minutos en el incubador a 37°C y se lavan las células dos veces con medio. La placa se observa en un microscopio invertido de fluorescencia y se obtienen 12 fotos por condición. Para analizar las imágenes se cuentan los núcleos condensados obteniendo un porcentaje de células con condensación nuclear.

15. Ensayo de actividad del complejo I, GAPDH y cuantificación de ATP

Para determinar la actividad del complejo I de la cadena respiratoria se utilizó el kit comercial *Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit* (Abcam) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Este kit se basa en tiras de absorción con anticuerpos monoclonales contra el complejo I que retienen el complejo de las muestras. La tira se

incuba en un buffer con NADH que es oxidado por el complejo induciendo la reducción del NBT (nitrotetrazolium blue) que forma un precipitado azul en la tira reactiva. En este ensayo se cargaron 20µg de proteína por muestra y tras la reacción se fotografiaron las tiras para poder cuantificarlas mediante el programa ImageJ.

Por otro lado, la actividad intracelular de GAPDH se analizó mediante el kit comercial *GAPDH Activity Assay* (BioVision). Brevemente, los lisados celulares se incuban con los reactivos proporcionados para convertir el sustrato GAP en 1,3-bisfosfoglicerato que reaccionará para generar un producto con color. Las muestras se leen a diferentes tiempos en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450nm. Los resultados se expresan en unidades de GAPDH por ml y minuto.

Por último, los cambios en el ratio ADP/ATP sirven para analizar la muerte y la viabilidad celular. Un incremento de ATP y disminución de ADP corresponde a células en proliferación mientras que bajos niveles de ATP indican apoptosis o necrosis. El ATP de las muestras reacciona con el sustrato D-luciferina en presencia de luciferasa produciendo bioluminiscencia. A continuación el ADP de las muestras se convierten en ATP y vuelven a reaccionar generando otro pico de luz que representa la concentración total de ADP y ATP. El contenido celular de ATP se analizó con el kit *ADP/ATP Ratio Assay* (Sigma) según las instrucciones en placas de 96 pocillos sembradas con Hep3B. Tras añadir 90µl del reactivo ATP, se agitó la placa brevemente y se detectó la bioluminiscencia obteniendo fotografías con ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Después de 10 minutos, se añadió el reactivo ADP y se volvió a detectar la bioluminiscencia. El ratio ADP/ATP se obtiene dividiendo la lectura de ADP (diferencia entre las dos lecturas) entre la primera lectura, correspondiente al ATP.

16. Array génico

Se utilizaron placas prediseñadas de 384 pocillos con un panel de *primers* específicos de genes relacionados con fibrosis, para el análisis de hígados fibróticos de ratón, y con cáncer hepático para las muestras de tumores subcutáneos (*PrimePCR Pathways*, Biorad). Se preparó la muestra de cDNA (concentración final de 10ng por pocillo) y la mix *iTaq Universal SYBR Green* (Biorad) y se pipeteó 10µl por pocillo. La placa se analizó como se ha descrito anteriormente y los resultados fueron normalizado con siguientes *housekeeping*: β-actina y TBP.

También se utilizó un panel de muestras humanas (TissueScan™ Liver Cancer cDNA Array I, Origene) para cuantificar la expresión relativa de GCS en muestras de tumores de CHC. Este array contiene 8 muestras normales, 13 muestras de patologías hepáticas y 26 muestras de CHC (7 en estadio I, 8-II, 8-III, 3-IV).

17. Modelos animales

Todos los procedimientos animales fueron aprobados por el comité ético de experimentación de la Universidad de Barcelona. Los animales fueron estabulados con libre disposición de agua y comida, temperatura controlada y con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

17.1. Modelos de EHNA

Para la generación de los modelos de EHNA, ratones C57BL/6J machos (8 semanas de edad) fueron alimentados durante 6 semanas con dieta MCD (Open source diets #A02082002B) o con dieta control (Open source diets D12450J; 10% kcal procedente de grasa). Estos ratones fueron separados al azar para ser tratados oralmente durante las dos últimas semanas con BGB324 100mg/kg o con vehículo (0.5% hidroxipropil metilcelulosa (Sigma-Aldrich) en solución salina).

En el modelo HFD, los ratones fueron alimentados con la dieta rica en grasas (60%) deficiente en colina y con un contenido de metionina de 0.1% (Open Source diets #A06071302) durante 8 semanas y tratados con BGB324 o vehículo las dos últimas semanas.

Animales deficientes en AXL (Jackson Laboratories, cepa #005777), en MERTK (cedidos por el laboratorio del Dr. Lemke) y animales controles de las mismas camadas también recibieron la dieta HFD durante 8 semanas.

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital (50 mg/kg), se extrajo sangre de la vena cava sacrificando el animal por exanguinación. El hígado fue extraído y pesado y se recogieron muestras para su posterior análisis.

17.2. Modelos de CHC

Para los modelos subcutáneos de CHC, se utilizaron ratones machos inmunodeprimidos *Swiss nude* de unas 6 semanas en condiciones libres de patógenos específicos. Células HepG2 cells (5×10^6) o BCLC9 (2.5×10^6) se inyectaron en medio DMEM sin FBS en los dos costados de los animales. Una vez alcanzado el volumen de 100 mm^3 los animales fueron distribuidos aleatoriamente en grupos para el tratamiento diario durante alrededor de 20 días. El sorafenib se ha administrado oralmente en una emulsión de etanol, cremofor y suero fisiológico (1:1:6) a una concentración de 80mg/kg. El Navitoclax también se administra oralmente a una concentración de 100mg/kg mientras que el PDMP se administra vía intraperitoneal a 60 mg/kg en una solución salina con 5% de Tween80. Los tumores se midieron cada 2 días con un pie de rey y el volumen se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{volumen (mm}^3\text{)} = 0.5 \times L \times W^2 ; \text{ siendo L el diámetro mayor y W el menor}$$

Al final del procedimiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital y posteriormente sacrificados por exanguinación. Se obtuvo sangre de la vena cava, muestras de hígado y muestra de tumores para su posterior análisis.

18. Determinaciones bioquímicas

La cuantificación en el suero de los animales de los enzimas aspartato y alanina aminotransferasa (AST, ALT), marcadores indirectos de lesiones hepáticas, y de colesterol y triglicéridos en homogenado hepático se realizó en el laboratorio CORE del Centro de Diagnóstico Biomédico del Hospital Clínic de Barcelona.

19. Histologías

19.1. Inclusión en parafina

Tras su extracción, los tejidos fueron incubados en formalina tamponada neutra durante 24 horas en caso de muestras hepáticas o 48 horas en caso de tumores. A posterior, los tejidos fueron conservados en alcohol 70% hasta su inclusión.

La inclusión se realiza en un procesador automático (Shanon citadel 1000) siguiendo el siguiente programa:

Paso	Tiempo	Solución
1	1:30h	H2O I
2	1:30h	H2O II
3	1h	EtOH 70 I
4	1h (Variable)	EtOH 70 II
5	1h	EtOH 96 I
6	1h	EtOH 96 II
7	1h	EtOH 100 I
8	1h	EtOH 100 II
9	1h	Xilol I

10	1h	Xilol II
11	2h	Parafina I
12	2h	Parafina II

Tras la inclusión, se montan los bloques de parafina y se cortan las muestras con un grosor de 7µm o 5µm (para las tinciones inmunohistoquímicas) en el micrótomo (Leica RM2155).

Antes de realizar las tinciones, se desparafina y rehidratan las muestras siguiendo el siguiente protocolo:

- Introducir los portaobjetos 10 minutos en la estufa a 80°C
- 10 minutos en xilol
- 10 minutos en xilol
- 5 minutos en etanol absoluto
- 3 minutos en etanol 90%
- 3 minutos en etanol 70%
- 3 minutos en etanol 30%
- 5 minutos de agua destilada

19.2. Tinción HE

La tinción hematoxilina-eosina permite observar la morfología del tejido tiñendo los componentes basófilos de azul como los núcleos y las estructuras acidófilas de color rosa como el citoplasma.

- Las muestras rehidratadas se tiñen con hematoxilina de Harris filtrada durante 4 minutos.
- Se lavan en agua corriente y posteriormente en una solución 4% de HCl en etanol y en una solución de agua amoniacal (4 gotas de amoníaco 25% en 200ml de agua).
- Se vuelven a lavar en agua corriente 2 minutos y se tiñen con eosina durante 2 minutos.
- Se deshidratan las muestras (1 minuto en cada etanol, pasando del etanol de 70% al absoluto y 5 minutos en xilol) y montan con el medio DPX para su observación en el microscopio óptico.

19.3. Tinción sirius red

La tinción sirius red permite detectar fibras de colágeno tiñéndolas de rojo.

- Las muestras rehidratadas se tiñen con una solución 0.1% de sirius red (Direct Red 80) en una solución de ácido pícrico (1.3%) durante 1 hora.
- Se lavan en agua acidificada 1% (2 ml de ácido acético glacial en 200 ml de agua destilada).
- Se deshidratan rápidamente las muestras (30 segundos en etanol de 70% y absoluto y 10 minutos en xilol) y montan con el medio DPX para su observación en el microscopio óptico.

Para el análisis de las tinciones, se cuantificaron seis fotografías por animal midiendo los % de áreas rojas mediante el programa ImageJ.

19.4. Inmunohistoquímicas

La inmunohistoquímica (IHQ) permite detectar antígenos específicos en muestras histológicas mediante anticuerpos primarios que se unen a la proteína de interés y anticuerpos secundarios marcados con biotina. La gran afinidad entre la biotina y avidina, conjugada al enzima HRP (Horse Radish Peroxidase) permite formar complejos que reaccionarán con el sustrato tetrahidrocloruro de 3,3' diaminobencidina (DAB), generando un producto marrón permanente en el tejido.

- El proceso de fijación con formalina produce puentes aldehídos que impiden la unión del anticuerpo primario, por ello hay que desmascarar el antígeno de las muestras desparafinadas con una solución de citrato 10mM pH6 durante 15 min a 100°C en el autoclave.
- Se bloquea la peroxidasa endógena en una solución de 3% de H₂O₂ en metanol 20 minutos y se lavan tres veces (5min.) las preparaciones con PBS.
- Se bloquean posibles uniones inespecíficas con suero 10 minutos y se incuban las muestras con el anticuerpo primario a 4°C (diluido en *Dako Antibody Diluent with Background Reducing*) durante toda la noche en una cámara húmeda.
- Se lavan las muestras en PBS (3x5min.) y se incuban con el anticuerpo secundario biotilado una hora.
- Tras otra serie de lavados, se añade el complejo avidina-HRP (ABC kit Standard, Vector Laboratories) durante 30 minutos.
- Se revelan las muestras con DAB en tampón peróxido hasta obtener señal, se lava con agua corriente y se tiñe con hematoxilina DAKO para obtener contraste (10 segundos).
- Tras lavar rápidamente con agua corriente, se montan con el medio acuoso (Aquatex) para su observación en el microscopio óptico.

19.5. Inmunofluorescencia:

Parecida a la IHQ, la inmunofluorescencia se basa en anticuerpos secundarios fluorescentes que permiten la detección de proteínas en microscopios de fluorescencia.

- Se desparafina los cortes y desmascara el antígeno como se ha descrito anteriormente.
- Se bloquean uniones inespecíficas con el diluyente *Dako Antibody Diluent with Background Reducing* y se incuban los anticuerpos primarios a 4°C toda la noche.
- Se lavan las preparaciones con PBS y se incuban a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario fluorescente 45 minutos.
- Se vuelven a lavar las muestras con PBS y se montan con el medio ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen) para su observación en microscopio de fluorescencia.

Anticuerpo	Dilución	Referencia	Casa comercial
PCNA	1/100	sc-56	Santa Cruz Biotech.
CD34	1/100	sc-18917	Santa Cruz Biotech.
F4/80	1/50	sc-18917	Santa Cruz Biotech.
α-SMA	1/1000	M0851	DAKO
AXL	1/500	C89E7	CellSignaling
anti-ratón IgG-Biotilizado	1/200	sc-2039	Santa Cruz Biotech.
anti-conejo IgG- Biotilizado	1/200	sc-2040	Santa Cruz Biotech.
anti-rata IgG- Biotilizado	1/200	sc-2065	Santa Cruz Biotech.
anti- ratón Alexa 555	1/300	A-31570	ThermoFisher
anti- conejo Alexa 488	1/300	A-21206	ThermoFisher
anti- rata Alexa 594	1/300	A-21209	ThermoFisher

19.6. Tunnel

La tinción Tunnel se basa en la detección de rupturas en la cadena de ADN que ocurre durante la apoptosis. Siguiendo las instrucciones del kit *In Situ Cell Death Detection* (Roche) los tejidos histológicos se desparafinan y se permeabilizaron en una solución recién hecha de 0.1% Tritón X-100 0.1% citrato de sodio. Tras un par de lavados en PBS de 5 minutos se incuban 1 hora a 37°C con el enzima TdT (*Terminal deoxynucleotidyl transferase*)

que incorpora nucleótidos marcados con fluoresceína en las terminaciones 3'-OH del ADN. Se incuban las preparaciones con Hoechst para marcar los núcleos celulares y se montan con medio de montaje fluorescente para su observación en microscopio de fluorescencia.

20. Cuantificación de hidroxiprolina

La hidroxiprolina y la hidroxilisina son los principales aminoácidos del colágeno. La cuantificación de hidroxiprolina es un método que permite cuantificar de manera indirecta el contenido de colágeno en tejidos. Mediante una hidrólisis ácida se libera la hidroxiprolina que reaccionará con diferentes reactivos para generar un cromóforo.

- Entre 20 y 50mg de hígado se homogeniza en HCl 6N en una proporción 1:10 y se introducen en criotubos en el autoclave a 121°C durante 20 minutos.
- El resultado de la hidrólisis se pasa a un microtubo y se centrifuga 10 minutos a 11000xg.
- 50µl de la muestra y de muestras estándar de hidroxiprolina (de 0 a 10µg/µl preparados en HCl) se mezclan con 450µl de solución cloramina-T y después de un vórtex suave se incuban a temperatura ambiente 25 minutos. Se producirá la oxidación de la hidroxiprolina y se formará un compuesto pirrol.
- Se añaden 500µl del reactivo Ehrlich aldehído preparado en fresco y se incuba a 65°C 20 minutos para favorecer el desarrollo del cromóforo.
- Se pipetea 150µl de cada reacción en una placa de 96 pocillos para la lectura de absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 550nm.

Preparación de los reactivos:

Solución Cloramina-T:

- 1.27 g Cloramina T
- 20 mL 2-Propanol al 50%
- 80 mL tampón acetato-citrato pH 6.5 (120g de trihidrato de acetato sodio, 46g de ácido cítrico 12ml de ácido acético y 334g de NaOH en 1L de agua destilada).

Reactivo Ehrlich aldehído:

- 15 g 4-Dimetilaminobenzaldehído
- 66 mL 2-Propanol al 50%
- 33ml de ácido perclórico al 70%

21. Ensayos ELISAs

ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica cuantitativa basada en la detección de proteínas mediante anticuerpos específicos. En este inmunoensayo de tipo sándwich se utiliza un anticuerpo unido a una superficie para anclar los antígenos y otro para amplificar y emitir la señal.

Para la detección de AXL, MERTK y GAS6 (humano y murino) se utilizaron los kits de ELISA DuoSet de R&D Systems. Para la detección de IL1-β y MCP1 se usaron kits de Peprotech. En ambos casos se siguieron las recomendaciones de las casas comerciales y, en resumen, se ejecutó el siguiente protocolo:

- Se cubre con anticuerpos específicos de captura una placa de 96 pocillos y se incuba toda la noche a temperatura ambiente para su inmovilización.
- Se lavan los pocillos 3 veces (300µl) con buffer de lavado (PBS con 0.05% Tween20).
- Se bloquean las uniones inespecíficas con una solución 1% de BSA durante 1 hora.
- Tras otra serie de lavados se incuban las muestras 2 horas.
- Se vuelven a lavar los pocillos y se añade el anticuerpo de detección, conjugado a biotina durante 2 horas.

- Se añade el enzima HRP conjugado a estreptavidina que se unirá a la biotina, se incuba 20 minutos y finalmente se lavan los pocillos para añadir el sustrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina o TMB) que induce una coloración amarillenta.
- Tras 20 minutos se para la reacción con una solución 2N de ácido sulfúrico obteniendo una coloración azul.
- La lectura de la placa se obtiene en el espectrofotómetro a una absorbancia de 450nm y a 540 para corregir. Los resultados se extrapolan según una recta patrón.

22. Muestras humanas

Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento de acuerdo con la declaración de Helsinki y los procedimientos fueron aprobados por el comité ético del Hospital Clínico de Barcelona.

En el estudio de EHNA, se analizaron muestras de suero para determinar los niveles de proteínas solubles de 12 individuos controles (8 hombres y 4 mujeres de 51.7±10.4 de edad) y 39 individuos con EHNA. El grupo de EHNA está formado 12 individuos (9 hombres y 3 mujeres) sin fibrosis pero con esteatosis (F0), otros 12 presentaban fibrosis en estadio F1-F3 (10 hombres y 2 mujeres) y 15 cirróticos (8 hombres y 7 mujeres). Por otro lado, se analizaron cortes histológicos de hígado de pacientes sanos o pacientes con cirrosis con EHNA sin CHC. Estas muestras fueron obtenidas en el biobanco del Hospital Clínic y en la siguiente tabla se detallan los parámetros biomédicos de los pacientes.

	Esteatosis F0 m(9) – f(3)	Fibrosis F1-F3 m(10) – f(2)	Cirrosis F4 m(8) – f(7)	Valores controles m(8) – f(4)
Edad	57.0±3.25	60.7±2.0	63.5±1.5	51.7±10.4
Bilirrubina (mg/dl)	0.62±0.06	0.74±0.07	3.19±1.50	0.2 – 1.0
Albumina (g/l)	44.5±0.6	44.1±0.7	37.3±1.8*#	35 - 50
Quick (%)	94.9±2.0	90.8±2.6	73.2±4.0*#	70 -100
Creatinina (mg/dl)	0.9±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.6 – 1.2
AST (U/l)	49.6±13.1	40.6±5.2	64.3±9.2#	10 - 40
ALT (U/l)	80.0±25.6	58.0±9.4	55.2±8.6	10 - 35
GGT (U/l)	97.3±36.6	131.4±34.2	168.0±37.1	5 - 40
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	218±20	202±15*	130±23*#	125 - 400
Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	8.2±0.9	6.7±0.4	5.6±0.8	3.5 – 11.0

Para el estudio de la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2, se utilizaron muestras pareadas de tumores y tejido adyacente no tumoral de 12 pacientes con CHC del Hospital Clínic. También se analizaron 10 muestras de hígados sanos de pacientes con cáncer colorrectal sometidos a cirugía.

23. Estadística

En los experimentos *in vitro*, los resultados se expresan como media \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Los datos de los experimentos *in vivo* y muestras humanas se expresan como media \pm error estándar. Para el análisis estadístico, los datos se introdujeron en el programa GraphPad Prism y se analizó mediante el test T de Student bilateral o mediante una ANOVA de un factor seguido de un test comparativo Newman-Keuls. Un p-valor menor de 0.05 se considera significativo.

Resultados

Los resultados obtenidos durante esta tesis se presentan mediante dos publicaciones, uno de primera autora y otro de segunda, y un tercer artículo en preparación.

Resultados 1:

Tutusaus, A.; de Gregorio, E.; Cucarull, B.; Cristóbal, H.; Aresté, C.; Graupera, I.; Coll, M.; Gausdal, G.; Lorens, J.; García de Frutos, P.; Morales, A.; Mari, M. **AXL targeting abrogates experimental non-alcoholic steatohepatitis (NASH) progression.** En preparación.

Resultados 2:

Stefanovic M; **Tutusaus A**; Martínez-Nieto GA; Bárcena C; de Gregorio E; Moutinho C; Barbero-Camps E; Villanueva A; Colell A; Marí M; García-Ruiz C; Fernández-Checa JC; Morales A. **Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma.** Oncotarget. 2016. Feb 16;7(7):8253-67. doi: 10.18632/oncotarget.6982

Resultados 3:

Tutusaus A; Stefanovic M; Boix L.; Cucarull B.; Zamora A.; Blasco L.; García de Frutos P.; Reig M.; Fernández-Checa J.C.; Marí M.; Colell A.; Bruix J.; Morales A. **Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma.** Oncotarget. 2018. Mar 30;9(24):16701-16717. doi: 10.18632/oncotarget.24673

Resultados 1: La inhibición de AXL reduce la progresión de la esteatohepatitis no alcohólica en modelos animales.

Tutusaus, A.; de Gregorio, E.; Cucarull, B.; Cristóbal, H.; Aresté, C.; Graupera, I.; Coll, M.; Gausdal, G.; Lorens, J.; García de Frutos, P.; Morales, A.; Mari, M. **AXL targeting abrogates experimental non-alcoholic steatohepatitis (NASH) progression.**

Para demostrar la función de AXL en la activación de las CEH, se analizó el efecto de la activación de este receptor en las células LX2, línea celular de CEH. Ya sea mediante la estimulación con GAS6 o mediante un anticuerpo activador, la activación de AXL induce la expresión de genes profibrogénicos como α -SMA o Col1A1 así como la secreción de MCP1 que en ambos casos es reducida por el inhibidor de AXL, BGB324 (Bemcentinib). Se demuestra también que el inhibidor bloquea la fosforilación de AKT y reduce la migración derivada de la activación de AXL en las células LX2.

Para evaluar la participación del eje GAS6/AXL en fibrosis derivada de EHNA, ratones C57BL/6 fueron alimentados con una dieta rica en grasas, deficiente en colina y con un contenido de metionina de 0.1% (HFD) durante 6 semanas y fueron tratados oralmente con el inhibidor BGB324 durante las dos últimas semanas. Esta dieta reproduce las características hepáticas de la enfermedad como esteatosis, inflamación y fibrosis hepática. En este modelo, se observa una menor tinción del colágeno y una disminución en la cuantificación de la hidroxiprolina, principal aminoácido del colágeno, en los animales tratados con BGB324. A nivel de expresión génica, genes fibrogénicos, como la MMP9, COL1A1 y α -SMA están disminuidos por el tratamiento con BGB324. Además, respecto a los animales HFD vehículo se observa una reducción de las células positivas para α -SMA, es decir CEH activadas. Además, este inhibidor reduce considerablemente la inflamación inducida por la dieta HFD. La expresión de citoquinas y quimioquinas inflamatorias disminuye con el tratamiento con BGB324 y se observa una menor infiltración de células inflamatorias F4/80 y una menor actividad de los neutrófilos.

Con la intención de analizar con más profundidad la fibrosis, inducida por la dieta HFD, se realizó un array de expresión génica específico de procesos fibrogénicos. Entre los genes más aumentados por la dieta y disminuidos por BGB324, destacan los relacionados con la activación de las CEH y la síntesis y degradación de matriz extracelular, así como factores de crecimiento, colágeno e integrinas, metaloproteinasas, inhibidores de metaloproteinasas y genes inflamatorios.

Resultados similares se observan con la dieta MCD, un modelo clásico de EHNA. Por lo tanto, la inhibición de AXL atenúa la fibrosis hepática y la inflamación en modelos experimentales de EHNA disminuyendo la activación de las CEH y reduciendo la expresión de citoquinas y quimioquinas.

En suero, los animales con ENHA ya sea por la dieta MCD o HFD, presentan niveles elevados de GAS6 y de AXL y MERTK solubles respecto a los animales control. Curiosamente, la simple administración de BGB324 induce un aumento de GAS6 en suero. Del mismo modo, en muestras de pacientes cirróticos con EHNA, se observa de suero un incremento de las tres proteínas. Sin embargo, sólo los niveles de AXL están elevados en estadios iniciales y aumentan progresivamente con el desarrollo de la enfermedad. Por lo que AXL destaca como marcador no invasivo no sólo de cirrosis pero también de estadios previos de la enfermedad.

Para estudiar este aumento de AXL, nos centramos en dos metaloproteinasas, ADAM10 y ADAM17 (TACE), principales responsables de la escisión del receptor según la literatura. En nuestro modelo de EHNA, tanto AXL como ADAM10 se encuentran sobreexpresadas en hígado respecto a los ratones control, mientras que la expresión de ADAM17 no varía. Para validar el papel de ADAM10 en la regulación de AXL tratamos *in vitro* una línea celular de CEH (LX2), de hepatoma (PLC/PRF/5) y de macrófagos (RAW264.7) con un inhibidor de esta

RESULTADOS

metaloproteinasa (GI254023X). En todos los tipos celulares, se observa una disminución significativa de los niveles de AXL liberados al medio pero es especialmente evidente en la línea de CEH, por la mayor expresión de AXL.

Ambos receptores de GAS6, AXL o MERTK, han sido relacionados con la fibrosis hepática (170), por ello, para determinar el papel de cada uno en la progresión de la EHNA, se reprodujo el modelo HFD en ratones deficientes en MERTK y en ratones deficientes en AXL. Los animales deficientes en MERTK presentan un mayor grado de fibrosis así como una inflamación agravada. Por otro lado, en los animales deficientes en AXL no se observan diferencias significativas en la cuantificación de las tinciones de colágeno aunque la expresión de genes inflamatorios y profibrogénicos tiende a disminuir. Por lo tanto, la ausencia total de AXL resulta menos efectiva que la inhibición farmacológica mediante BGB324.

La presencia de AXL también se analizó en muestras histológicas de hígados de pacientes cirróticos con EHNA mediante tinciones inmunohistoquímicas. Los hígados cirróticos presentan un mayor número de células AXL positivas que coincide con células no parenquimales. Para determinar qué tipo celular expresa AXL, se llevaron a cabo tinciones de inmunofluorescencia en estas muestras humanas de EHNA. Estas tinciones muestran que en pacientes cirróticos AXL colocaliza con α -SMA y con F4/80. Por lo tanto, AXL es expresado por las células estrelladas hepáticas pero también en macrófagos o células de Kuffper, corroborando una función importante en fibrosis e inflamación hepática.

AXL TARGETING ABROGATES EXPERIMENTAL NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) PROGRESSION

Anna Tutusaus^{1,2}, Estefania de Gregorio¹, Blanca Cucarull^{1,2}, Helena Cristóbal¹, Cristina Aresté¹,
Isabel Graupera³, Mar Coll³, Gro Gausdal⁴, James B. Lorens^{4,5}, Pablo García de Frutos¹, Albert
Morales^{1,6}, Montserrat Mari¹

Affiliations: ¹Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain. ²Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Barcelona, Spain. ³Liver Unit, Hospital Clínic, CIBEREHD, Barcelona, Spain. ⁴BerGenBio AS, Bergen, Norway. ⁵Department of Biomedicine, Centre for Cancer Biomarkers, University of Bergen, Bergen, Norway. ⁶Barcelona Clinic Liver Cancer (BCLC) Group, Liver Unit, Hospital Clínic, CIBEREHD, Barcelona, Spain.

Keywords: Bemcentinib (BGB324), liver fibrosis, Hepatic Stellate Cells, TAM receptors, GAS6 signaling.

Abbreviations: ECM, extracellular matrix; HCC, hepatocellular carcinoma; HSCs hepatic stellate cells; IHC, Immunohistochemistry; MMP, mitochondrial membrane potential; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NASH, non-alcoholic steatohepatitis; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ROS, reactive oxygen species; sAXL, soluble AXL; sMERTK, soluble MERTK; WT, wild type.

INTRODUCTION

Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), despite being mostly asymptomatic, suffer increased cardiovascular and mortality risk. Among them, individuals with NASH, an increasing liver pathology in developed countries, are predisposed to cirrhosis and liver-related complications.[1-3] In NASH patients, after cardiovascular disease and liver cancer, cirrhosis is the third leading cause of death and it is expected to be the most common indication for liver transplantation. At present, lifestyle modification with dietary restrictions is the standard of treatment for patients with NASH.[4] Recently, therapies based on the activation of specific nuclear factors such as LXR (obeticholic acid) or PPAR (elafibranor), or directed against chemokine receptors (cenicriviroc) have obtained positive results in clinical trials.[5-7] However, there are no approved drug treatments for NAFLD and NASH. Several other emerging therapies aimed to target NASH in a pre-cirrhotic stage, when liver fibrosis and hepatic inflammation are still recoverable, are being tested.[8] Liver fibrosis, characterized by accumulation of extracellular matrix (ECM) components from activated hepatic stellate cells (HSCs), is associated to chronic liver injury and disease severity.[9,10] In NASH, fibrosis is accompanied by liver inflammation by both resident macrophages (Kupffer cells) and infiltrating cells, remodeling of the microenvironment that promote liver degeneration and tumor development.[11-13]

Growth arrest-specific gene 6 (GAS6) activates receptor tyrosine kinases AXL, MERTK and Tyro3, known as TAM receptors, regulates innate immune response and it is implicated in cancer progression.[14,15] GAS6 shares structural and sequence similarity with the anticoagulant protein S (ProS) that also binds TAM receptors, however their biological roles differ.[16] In particular, GAS6 has no significant role in coagulation and ProS does not activate AXL under physiological conditions. In liver pathologies, GAS6 is hepatoprotective in ischemia/reperfusion-induced damage,[17] and participates in wound healing response.[18,19] Hepatic expression of GAS6/AXL is mainly detected in macrophages, including Kupffer cells, and in activated HSCs.[20] GAS6/AXL participates in HSC activation and in damage by CCl₄ exposure in mice.[21] In patients, GAS6 and sAXL serum levels increase during chronic liver disease progression in alcoholic liver disease, and in HCV patients. Concurrently, mRNA expression of MERTK, the other main receptor of GAS6 in the liver, has been associated with liver fibrosis and NASH.[22,23] This scenario suggests a role of GAS6 signaling in NASH development.[24] Our data revealed that bemcentinib, the first selective small molecule inhibitor of AXL (BGB324) in phase II clinical trials for cancer,[25] blocked HSC transdifferentiation and macrophage activation. Oral bemcentinib administration greatly diminished liver fibrosis and hepatic inflammation in mice fed with NASH diets. To validate AXL involvement in human NASH, we tested serum changes in GAS6 and TAM receptors in NASH patients. sAXL increased in all NASH staged, while GAS6 and MERTK were only overexpressed in cirrhotic NASH patients. Our results identify AXL as an interesting serum biomarker of fibrosis progression in human NASH and the GAS6/AXL axis as a therapeutically targetable pathway to prevent NASH progression. In summary, our data support specific AXL inhibition as a novel therapeutic alternative for NASH.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and cell treatment

Commercially available PLC/PRF/5, RAW264.7 cells and THP-1 (ECACC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used. LX2 cells were kindly given by Dr. Ramón Bataller.[26] All cell lines are mycoplasma-free. THP-1 cells were differentiated with 100ng/ml of PMA (Sigma-Aldrich) for 3 days and macrophages were stimulated with LPS (*E. coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) at 50 ng/ml. Cells were treated with 0.25 μ M bemcentinib (BergenBio), 50 μ M

ADAM10 inhibitor (GI254023X, Sigma-Aldrich) , 1µg/mL rhGas6 (R&D Systems), and 10 nM AXL activating antibody (AF154, R&D).

***In vivo* models**

Animal studies, in accordance with the principles and procedures outlined in the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, were approved by the institutional animal care committee (Universitat de Barcelona). Wild type (WT), *Axl*^{-/-} (Jackson Laboratories, Mouse Strain #005777) and *Mertk*^{-/-} (Dr. Lemke Lab) C57BL/6 male 8–10 weeks old mice were used. In experiments using *Axl*^{-/-} or *Mertk*^{-/-} mice, controls were sibling littermates. All mice were maintained with a 12 hour light/dark cycle (lights on at 8:00 am) in a temperature-controlled environment. To induce NASH, mice were fed a methionine and choline deficient (MCD) (Open Source diets #A02082002B) or a high fat choline deficient with 0.1% methionine HFD (60% kcal) (Open Source diets #A06071302) diet for 6 or 8 weeks respectively, receiving daily doses of bemcentinib (100 mg/kg) or vehicle by oral gavage for the last two weeks. Alanine and aspartate transaminases (ALT and AST), triglycerides and cholesterol levels in serum were measured using a biochemical analyzer at the Clinic Hospital Core, Barcelona.

Human samples

For the control group, serums from 12 individuals (8 males and 4 females with average age of 51.7±10.4) were used to measure GAS6, MERTK and AXL levels. For the NASH group, serum from patients with steatosis F0 (9 males and 3 females), fibrosis F1-F3 (10 males and 2 females) and cirrhosis F4 (8 males and 7 females) were analyzed. Additional biochemical data are shown (Table 1). Human liver slides from healthy individuals or cirrhotic NASH patients (without hepatocellular carcinoma) were from the Biobank of the Hospital Clinic. All subjects gave written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol, approved by ethical committees from the Hospital Clinic (Barcelona), followed ethical guidelines on handling human samples.

Wound healing assay

LX2 were plated in 6-well plates, and upon confluence, a scratch was made in cell layer with a 200-µL sterile micropipette tip. Cells were treated with bemcentinib and AXL activating antibody (AF154, R&D). Cells were photographed at baseline (t = 0h) and after 24 hours using an Olympus IX-70 microscope. ImageJ software was used to measure wound closure and percentage of closure relative to control was calculated.

Other protein, biochemical determinations and staining were performed as detailed in supplemental methods.[21,27,28]

Gene array

A predesigned 384-well mouse fibrosis panel for use with SYBR Green (Bio-rad) was used following the manufacturer's instructions. Briefly, after isolating RNA with the TRIzol reagent, the corresponding cDNA was synthesized using the iScript advanced cDNA synthesis kit (Bio-rad). Once cDNA is obtained the PCR reaction mix is prepared (iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix) and added to the 384-well plate where all the primers are lyophilized. Results are corrected and normalized to the housekeeping genes β -actin and TBP.

Statistical analysis

All *in vitro* experiments were repeated at least three times. Results are expressed as mean±S.D for cell studies, and as mean±S.E.M. for *in vivo* studies. Statistical comparisons were performed using unpaired two-tailed

Student's t test or One-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test. All analyses were performed using GraphPad Prism. A P value < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Bemcentinib blocked GAS6/AXL-activated pro-fibrogenic genes in human HSCs and reduced MCP-1 production.

GAS6 upregulation of fibrosis-related genes in LX2 activated human stellate cells, through AXL/AKT activation, is abolished by AXL silencing or pharmacological AXL inhibition.[21] Although bemcentinib does not affect MERTK phosphorylation even in the micromolar range in LX2 cells[21], bemcentinib concentrations were tested to eliminate GAS6-dependent AKT activation at lower doses (Supplemental Figure 1). Bemcentinib not only completely blocked GAS6-dependent α -SMA and COL1A1 expression in LX2 cells (Figure 1A) but also MCP-1 release to the medium (Figure 1B).

To verify that AXL activation is sufficient to induce fibrosis in HSCs, we incubated LX2 cells with a human AXL activating antibody (α -AXL).[29] α -AXL induction of AKT phosphorylation (Figure 1D) and the increase expression of α -SMA and COL1A1 (Figure 1D) were suppressed by bemcentinib addition. In contrast, gene expression induced by TGF- β was not blocked by bemcentinib (data not shown) in agreement with a specific effect on AXL-dependent signaling. Moreover, AXL activation potentiated LX2 cells migration in a wound-healing experiment, while bemcentinib reduced the motility of activated HSCs, particularly after α -AXL addition (Figure 1E).

AXL deficiency has been reported to increase hepatic inflammation after lipopolysaccharide (LPS) or acute carbon tetrachloride (CCl₄) administration,[30] in contrast to previous data in chronic liver damage.[21] To verify this point, we analyzed the effect of bemcentinib after LPS challenge using PMA-differentiated THP-1 macrophages. LPS induced MCP-1 mRNA increase, was blocked by bemcentinib (Figure 1F), while bemcentinib did not affect TNF mRNA expression (data not shown).

Liver fibrosis and inflammation induced by MCD diet is reduced by AXL inhibition.

Next we analyzed the role of AXL in an experimental murine NASH model. Mice were fed with Methionine- and Choline-Deficient (MCD) diet[31] during 6 weeks and daily gavaged with vehicle or bemcentinib (BGB324) for the last 2 weeks before sacrifice (Figure 2A). H&E staining of liver samples showed macrovesicular fat in MCD-fed mice and collagen accumulation as visualized with Sirius Red dye (Figure 2B). Quantification showed that bemcentinib-treated mice displayed reduced fiber formation after MCD feeding. Similarly, collagen deposition was reduced by bemcentinib administration as measured by hydroxyproline levels (Figure 2C). Transaminase levels (ALT) were similarly increased in all MCD-treated mice (Figure 2D). In line with fibrosis reduction, α -SMA mRNA levels were decreased in MCD-fed mice receiving bemcentinib (Figure 2E). Reduction in expression of inflammatory genes, such as TNF or MCP-1, was noticed after AXL inhibition in MCD-fed mice, although changes in macrophage population or neutrophil infiltration were not significant (Figure 2E).

Liver inflammation and fibrosis induced by a HFD is decreased by AXL inhibition.

To verify AXL targeting efficacy in NASH pathology, we tested a second diet that allowed mice feeding for longer periods of time (Figure 3A),[27,32] causing stronger liver fibrosis, without animal weakening and the severe loss of body weight often associated to MCD feeding (Supplemental Figure 2). Animals under a High-Fat (60%) Choline-Deficient Methionine-Restricted (0.1%) diet (HFD) increased the liver/body weight ratio (Supplemental

Figure 3), exhibiting extensive liver fibrosis and fatty liver after two months (Figure 3B). High triglyceride levels (Figure 3C) and liver damage (Figure 3D) were also observed. Bemcentinib administration significantly reduced fibrosis development in the liver as denoted after quantification of Sirius Red staining (Figure 3B) and collagen deposition by hydroxyproline measurement (Figure 3E).

In agreement, mRNA levels of different pro-fibrotic genes such as α -SMA, COL1A1 or MMP9 were remarkably decreased by AXL inhibition (Figure 4A-B). Not only ECM status was preserved in bemcentinib-treated mice, but also a clear reduction in pro-inflammatory genes was detected after HFD feeding. mRNA levels of the chemokine MCP-1 and its receptor CCR2 and TNF were lowered by bemcentinib, as well as macrophage (F4/80) and neutrophil (MPO) infiltration (Figure 4A-C).

Regarding GAS6/TAM receptors signaling, GAS6, sAXL and sMERTK serum levels were all increased by HFD (Figure 5A-C). Of note, bemcentinib administration increased GAS6 serum levels without changing sAXL or sMERTK levels.

To further characterize NASH-related genes and identify AXL-dependent mechanisms, we analyzed an mRNA array pre-designed for fibrosis-and inflammation-related genes. As observed (Figure 5D), AXL inhibition repressed the expression of numerous NASH-induced mRNAs. Among the genes more markedly affected by bemcentinib we found not only metalloproteinases, integrins or collagens, but also cytokines, chemokines, and enzymes that have been related to NASH induction such as Lysyl oxidase (LOX) or urokinase (uPA), featuring extracellular matrix remodeling.

Since several metalloproteinases that modify the hepatic ECM are increased in NASH development, we analyzed metalloproteinases ADAM10 and ADAM17,[33,34] sheddases potentially responsible for sAXL serum increases, and AXL mRNA levels. In liver samples from NASH mice, not only ADAM10 was upregulated after HFD-feeding but also AXL transcription, while ADAM17 was unaffected (Figure 5E). Of note, bemcentinib administration to mice did not alter the levels of ADAM10 and ADAM17 expression (data not shown). To certify ADAM10 role in sAXL release, different cell lines were exposed to ADAM10 inhibitor and sAXL measured in the medium. Activated HSC LX2 exhibited higher sAXL levels than hepatoma PLC5 cells and RAW264.7 macrophages. sAXL concentration was significantly reduced in all cell lines exposed to ADAM10 inhibition (Figure 5F).

AXL knockout mice were partially protected against HFD-induced damage while MERTK deficient animals suffered aggravated lesions.

Bemcentinib reduced HFD-induced liver fibrosis and inflammation by blocking AXL signaling while increased GAS6 serum levels. To verify if total absence of AXL may recapitulate the protection observed after AXL inhibition, *Axl*^{-/-} mice were fed with HFD for two months (Figure 6A). After NASH-diet feeding, no significant differences in H&E, Sirius Red staining or ALAT levels were detected between wild type (WT) and AXL deficient mice (Figure 6B-C). Although a tendency towards lower expression of fibrosis-related genes (Figure 6D) and a decrease in inflammation-related genes (Figure 6E-F) was observed in HFD-fed AXL KO mice, this did not reach the level observed after bemcentinib treatment.

MERTK, the other TAM receptor with prominent expression in the liver, may also be activated by GAS6 and has recognized roles in fibrogenesis, inflammation and hepatoprotection. Evident liver deterioration was detected on H&E slides and in transaminase levels in *Mertk*^{-/-} mice after HFD feeding (Figure 7A-C). In parallel, liver samples from HFD-fed MERTK deficient mice displayed a significant elevation in collagen deposition compared to HFD-fed WT mice (Figure 7B). In addition, increased number of inflammatory foci was detected in numerous *Mertk*^{-/-} mice

(Figure 7D) and pro-inflammatory gene expression was enhanced (Figure 7E-F). These results underscored an important protective role of MERTK signaling during NASH development and instructs against compounds that could inhibit MERTK in a context of active fibrogenesis and liver inflammation.

AXL levels are increased in the serum and liver of NASH patients.

GAS6, soluble AXL (sAXL) and MERTK (sMERTK) levels have been found altered in patients suffering chronic liver disease.[21,22,35,36] However, not all three measurements have been performed simultaneously in serum from NASH patients with different degrees of the disease. Addressing this issue, we detected by ELISA increased levels of GAS6, sAXL and sMERTK in cirrhotic NASH patients (Figure 8A-C), compared to control individuals or patients with low-grade NASH (steatosis or fibrosis). However, only sAXL was augmented in early stages of NASH, with mean values increasing with the severity of the disease (Figure 8C).

Since AXL activation leads to proteolytic shedding of the AXL extracellular from the cell surface,[37] sAXL levels suggest hepatic activation of AXL during NASH progression. Accordingly, cirrhotic NASH patients individuals exhibited increased liver AXL expression (Figure 8D), with a pattern of AXL overexpression in liver non-parenchymal cells. To better characterize AXL upregulation, we analyzed AXL (green) by immunofluorescence and compared it to α -SMA and F4/80 (red) hepatic distribution (Figure 8E). The punctuated AXL signal only overlaps (yellow) with a small portion of the α -SMA signal and with specific macrophages, in agreement with its predicted expression in activated HSCs and Kupffer cells.

DISCUSSION

At present, several therapies aimed to target NASH in a pre-cirrhotic stage, when liver fibrosis and hepatic inflammation are still reversible, are being evaluated. GAS6/AXL relevance in HSC activation and experimental fibrosis by CCl₄ exposure suggested a role for AXL signaling in NASH development. Our current data supports the hypothesis that GAS6/AXL promotes NASH development and that selective small molecule AXL targeting is a new opportunity in NASH treatment. We and others have shown previously the pro-fibrotic capacities of GAS6 signaling, in liver [21,22,36] and recently in other organs.[38] Our results reveal that GAS6 or AXL activation alone is enough to induce strong AKT phosphorylation and HSC activation, promoting pro-fibrogenic extracellular changes and migration. Importantly, bemcentinib not only suppressed GAS/AXL-induced HSC activation but also had an anti-inflammatory effect, *in vitro* in THP-1 cells and *in vivo* in NASH models.

In animal models, bemcentinib showed a powerful anti-fibrotic response. Interestingly, pharmacological inhibition of GAS6/AXL by bemcentinib showed better response in our animal NASH models than genetic ablation in *Axl*^{-/-} mice. It is possible that bemcentinib targets the pro-fibrotic effect of AXL signaling, while preserving other liver protecting functions of the system. Furthermore, *Axl*^{-/-} mice did not show an increase in serum GAS6, in contrast to after bemcentinib administration. The positive protecting role of GAS6 in ischemia/reperfusion-induced liver damage,[17] and in liver wound healing response[18,19] may support GAS6 as a hepatoprotective factor induced by bemcentinib. Moreover, the anti-inflammatory role of GAS6 in macrophages via MERTK may justify the liver deterioration observed in *Mertk*^{-/-} mice and the improvement in NASH livers after bemcentinib administration. This result concurs with recent data underscoring the role of MERTK in the homeostatic resolution of inflammation after acute liver failure in human and experimental models, and the aggravated damage described in *Mertk*^{-/-} mice exposed to acetaminophen overdose.[39,40] Therefore, despite a potential anti-fibrotic effect of MERTK inhibitors in HSCs *in vitro*, dual AXL-MERTK inhibitors,[41,42] with potential value in cancer treatment, may jeopardize the protection achieved by AXL blockade in NASH treatment. Regarding this point, bemcentinib has a very low inhibitory effect on MERTK, with an IC₅₀ 100 fold higher than on AXL, which is not reached in *in vivo*

administration.[43] Certainly, achieving a cell-specific inhibition of TAM is a challenge in order to devise a useful strategy for NASH that could be translated to the clinic.

Interestingly, other studies performed with bemcentinib have shown its effect potentiating antitumor immune response,[44-46] particularly favored in combination with checkpoint inhibitors such as the anti-PD-1 agent nivolumab, recently FDA-approved for advanced liver cancer. In fact, several approved cancer drugs, such as cabozantinib and sunitinib, have potent activity against AXL, indicating that this inhibition may be well tolerated, or even beneficial, in the clinic.[46] In HCC patients, high levels of Axl and CXCL5 correlated with advanced tumor stages, recruitment of neutrophils into HCC tissue and reduced survival.[47] Therefore, an antitumoral action of bemcentinib could be an additional benefit for NASH individuals, predisposed to develop liver cancer due to their pro-tumorigenic liver microenvironment.

Our results indicate that AXL is a pro-fibrogenic tyrosine kinase that promotes HSC activation, that sAXL serum levels increased during NASH progression in patients and AXL targeting with the small molecule inhibitor bemcentinib effectively reduced liver fibrosis and inflammation in experimental models of NASH. Bemcentinib administration to cancer patients has been evaluated for long time periods (up to twelve months), having good safety and tolerability, making it a plausible molecule for future clinical trials in NASH. Irrespective of the selected compound, bemcentinib or other AXL blockers that may have similar experimental capabilities, our results support AXL targeting as an interesting novel strategy in the treatment of human NASH.

REFERENCES

- 1 Younossi ZM, Loomba R, Rinella ME, et al. Current and future therapeutic regimens for nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2018;68:361-71.
- 2 Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA* 2015;313:2263-73.
- 3 Younossi ZM, Koenig AB, Abdelatif D, Fazel Y, Henry L, Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology* 2016;64:73-84.
- 4 Schuppan D, Surabattula R, Wang XY. Determinants of fibrosis progression and regression in NASH. *J Hepatol* 2018;68:238-50.
- 5 Ratziu V, Harrison SA, Francque S, et al. Elafibranor, an Agonist of the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha and -delta, Induces Resolution of Nonalcoholic Steatohepatitis Without Fibrosis Worsening. *Gastroenterology* 2016;150:1147-59 e5.
- 6 Neuschwander-Tetri BA, Loomba R, Sanyal AJ, et al. Farnesoid X nuclear receptor ligand obeticholic acid for non-cirrhotic, non-alcoholic steatohepatitis (FLINT): a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2015;385:956-65.
- 7 Friedman SL, Ratziu V, Harrison SA, et al. A randomized, placebo-controlled trial of cenicriviroc for treatment of nonalcoholic steatohepatitis with fibrosis. *Hepatology* 2018;67:1754-67.
- 8 Musso G, Cassader M, Gambino R. Non-alcoholic steatohepatitis: emerging molecular targets and therapeutic strategies. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:249-74.
- 9 Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:397-411.
- 10 Hagstrom H, Nasr P, Ekstedt M, et al. Fibrosis stage but not NASH predicts mortality and time to development of severe liver disease in biopsy-proven NAFLD. *J Hepatol* 2017;67:1265-73.
- 11 Hernandez-Gea V, Toffanin S, Friedman SL, Llovet JM. Role of the microenvironment in the pathogenesis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2013;144:512-27.
- 12 Couluouarn C, Clement B. Stellate cells and the development of liver cancer: therapeutic potential of targeting the stroma. *J Hepatol* 2014;60:1306-9.
- 13 Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, et al. Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer. *Sci Rep* 2015;5:7916.
- 14 Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol* 2008;8:327-36.
- 15 Graham DK, DeRyckere D, Davies KD, Earp HS. The TAM family: phosphatidylserine sensing receptor tyrosine kinases gone awry in cancer. *Nat Rev Cancer* 2014;14:769-85.
- 16 Fernandez-Fernandez L, Bellido-Martin L, Garcia de Frutos P. Growth arrest-specific gene 6 (GAS6). An outline of its role in haemostasis and inflammation. *Thromb Haemost* 2008;100:604-10.
- 17 Llacuna L, Barcena C, Bellido-Martin L, et al. Growth arrest-specific protein 6 is hepatoprotective against murine ischemia/reperfusion injury. *Hepatology* 2010;52:1371-9.
- 18 Couchie D, Lafdil F, Martin-Garcia N, Laperche Y, Zafrani ES, Mavier P. Expression and role of Gas6 protein and of its receptor Axl in hepatic regeneration from oval cells in the rat. *Gastroenterology* 2005;129:1633-42.
- 19 Lafdil F, Chobert MN, Deveaux V, et al. Growth arrest-specific protein 6 deficiency impairs liver tissue repair after acute toxic hepatitis in mice. *J Hepatol* 2009;51:55-66.
- 20 Lafdil F, Chobert MN, Couchie D, et al. Induction of Gas6 protein in CCl4-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells. *Hepatology* 2006;44:228-39.
- 21 Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *J Hepatol* 2015;63:670-8.

- 22 Petta S, Valenti L, Marra F, et al. MERTK rs4374383 polymorphism affects the severity of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 2016;64:682-90.
- 23 Musso G, Cassader M, De Michieli F, et al. MERTK rs4374383 variant predicts incident nonalcoholic fatty liver disease and diabetes: role of mononuclear cell activation and adipokine response to dietary fat. *Hum Mol Genet* 2017;26:1747-58.
- 24 Mari M, Tutusaus A, Garcia de Frutos P, Morales A. Genetic and clinical data reinforce the role of GAS6 and TAM receptors in liver fibrosis. *J Hepatol* 2016;64:983-4.
- 25 Sheridan C. First Axl inhibitor enters clinical trials. *Nat Biotechnol* 2013;31:775-6.
- 26 Xu L, Hui AY, Albanis E, et al. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 2005;54:142-51.
- 27 de Mingo A, de Gregorio E, Moles A, et al. Cysteine cathepsins control hepatic NF-kappaB-dependent inflammation via sirtuin-1 regulation. *Cell Death Dis* 2016;7:e2464.
- 28 Recarte-Pelz P, Tassies D, Espinosa G, et al. Vitamin K-dependent proteins GAS6 and Protein S and TAM receptors in patients of systemic lupus erythematosus: correlation with common genetic variants and disease activity. *Arthritis Res Ther* 2013;15:R41.
- 29 Richard AS, Shim BS, Kwon YC, et al. AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:2024-29.
- 30 Han J, Bae J, Choi CY, et al. Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice. *Autophagy* 2016;12:2326-43.
- 31 Caballero F, Fernandez A, Matias N, et al. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione. *J Biol Chem* 2010;285:18528-36.
- 32 Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* 2013;94:93-103.
- 33 Orme JJ, Du Y, Vanarsa K, et al. Heightened cleavage of Axl receptor tyrosine kinase by ADAM metalloproteases may contribute to disease pathogenesis in SLE. *Clin Immunol* 2016;169:58-68.
- 34 Atapattu L, Saha N, Chheang C, et al. An activated form of ADAM10 is tumor selective and regulates cancer stem-like cells and tumor growth. *J Exp Med* 2016;213:1741-57.
- 35 Staufer K, Dengler M, Huber H, et al. The non-invasive serum biomarker soluble Axl accurately detects advanced liver fibrosis and cirrhosis. *Cell Death Dis* 2017;8:e3135.
- 36 Dengler M, Staufer K, Huber H, et al. Soluble Axl is an accurate biomarker of cirrhosis and hepatocellular carcinoma development: results from a large scale multicenter analysis. *Oncotarget* 2017;8:46234-48.
- 37 Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nat Immunol* 2014;15:920-8.
- 38 Espindola MS, Habel DM, Narayanan R, et al. Targeting of TAM Receptors Ameliorates Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;197:1443-56.
- 39 Triantafyllou E, Pop OT, Possamai LA, et al. MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure. *Gut* 2018;67:333-47.
- 40 Mukherjee SK, Wilhelm A, Antoniadou CG. TAM receptor tyrosine kinase function and the immunopathology of liver disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2016;310:G899-905.
- 41 Kim JE, Kim Y, Li G, et al. MerTK inhibition by RXDX-106 in MerTK activated gastric cancer cell lines. *Oncotarget* 2017;8:105727-34.
- 42 Gilmour M SA, Ottmann OG, Hills RK, Knapper S, Zabkiewicz J. AXL/ Mer Inhibitor ONO-9330547 As a Novel Therapeutic Agent in a Stromal Co-Culture Model of Primary Acute Myeloid Leukaemia (AML). *Blood*, 2016:2754.

RESULTADOS

- 43 Holland SJ, Pan A, Franci C, et al. R428, a selective small molecule inhibitor of Axl kinase, blocks tumor spread and prolongs survival in models of metastatic breast cancer. *Cancer Res* 2010;70:1544-54.
- 44 Guo Z, Li Y, Zhang D, Ma J. Axl inhibition induces the antitumor immune response which can be further potentiated by PD-1 blockade in the mouse cancer models. *Oncotarget* 2017;8:89761-74.
- 45 Ludwig KF, Du W, Sorrelle NB, et al. Small-Molecule Inhibition of Axl Targets Tumor Immune Suppression and Enhances Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Res* 2018;78:246-55.
- 46 Ferguson FM, Gray NS. Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:353-77.
- 47 Haider C, Hnat J, Wagner R, et al. Transforming Growth Factor-beta and Axl Induce CXCL5 and Neutrophil Recruitment in Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* 2018.

TABLES

	STEATOSIS F0 m(9) – f(3)	FIBROSIS F1-F3 m(10) – f(2)	CIRRHOSIS F4 m(8) – f(7)	CONTROL Values m(8) – f(4)
Age	57.0±3.25	60.7±2.0	63.5±1.5	51.7±10.4
Billirubin (mg/dl)	0.62±0.06	0.74±0.07	3.19±1.50	0.2 – 1.0
Albumin (g/l)	44.5±0.6	44.1±0.7	37.3±1.8*#	35 - 50
Quick (%)	94.9±2.0	90.8±2.6	73.2±4.0*#	70 -100
Creatinin (mg/dl)	0.9±0.1	0.9±0.1	0.8±0.1	0.6 – 1.2
AST (U/l)	49.6±13.1	40.6±5.2	64.3±9.2#	10 - 40
ALT (U/l)	80.0±25.6	58.0±9.4	55.2±8.6	10 - 35
GGT (U/l)	97.3±36.6	131.4±34.2	168.0±37.1	5 - 40
Platelets (x10 ³ /mm ³)	218±20	202±15*	130±23*#	125 - 400
Leukocytes (x10 ³ /mm ³)	8.2±0.9	6.7±0.4	5.6±0.8	3.5 – 11.0

Table 1. Biochemical data from control individuals and NASH patients. For the control group, serums from 12 individuals (7 males and 5 females with average age of 51.7±10.4) with BMI<23 were used to measure GAS6 and AXL levels. Reference ranges for the each biochemical parameter are provided (right column), as established for normal individuals according to Hospital Clinic Core Lab (Barcelona, Spain). m=male; f=female. Results are expressed as mean±SEM, and in bold for means out of control values. *, $P\leq 0.05$ vs. steatosis group (F0), #, $P\leq 0.05$ vs. fibrosis (F1-F3) group.

FIGURES:

Figure 1

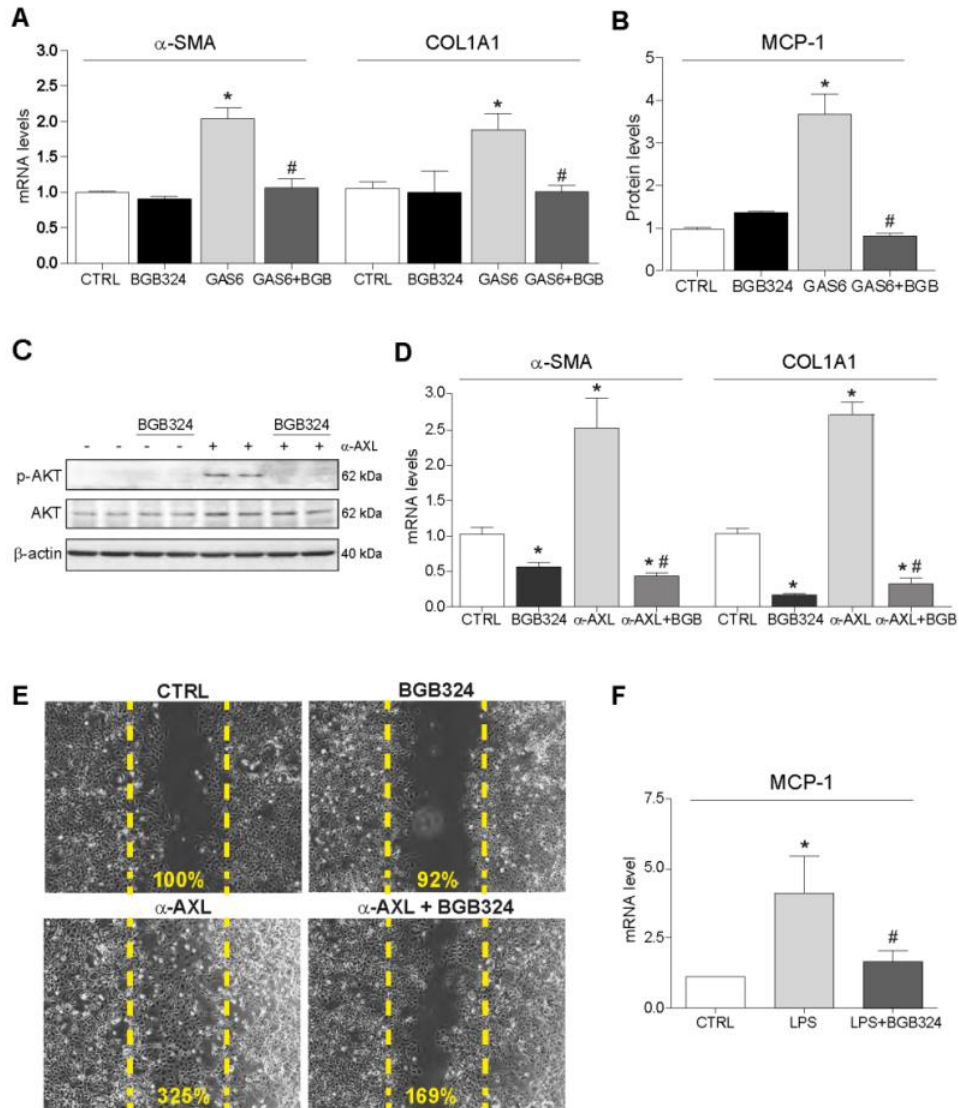


Figure 1. Bemcentinib blocked GAS6/AXL-induced fibrogenesis in HSC cells and reduced macrophage MCP-1 production. **A**, α -SMA and COL1A1 mRNA levels in GAS6-treated (1 μ g/ml) LX2 cells pre-incubated with BGB324 (0.25 μ M) or vehicle. **B**, MCP-1 release measured by ELISA in cultured medium after 16h. **C**, Representative western blot of p-AKT and AKT in LX2 cells treated with AXL activating antibody (α -AXL, 10nM, 15min) and bemcentinib (0.25 μ M). **D**, mRNA expression level of α -SMA and COL1A1 in LX2 cells treated with AXL activating antibody (α -AXL, 10nM, 24h) and bemcentinib (0.25 μ M). *, $P \leq 0.05$ vs. control cells, #, $P \leq 0.05$ vs. α -AXL-treated cells. Student's t test. **E**, Representative images of wound healing experiments and quantification in LX2 cells treated with α -AXL (10nM, 24h) and bemcentinib (0.25 μ M) for 24h. **F**, mRNA expression level of MCP-1 and TNF in PMA-activated THP-1 cells exposed to LPS (50ng/mL, 2h) and bemcentinib (0.25 μ M). *, $P \leq 0.05$ vs. control cells, Student's t test.

Figure 2

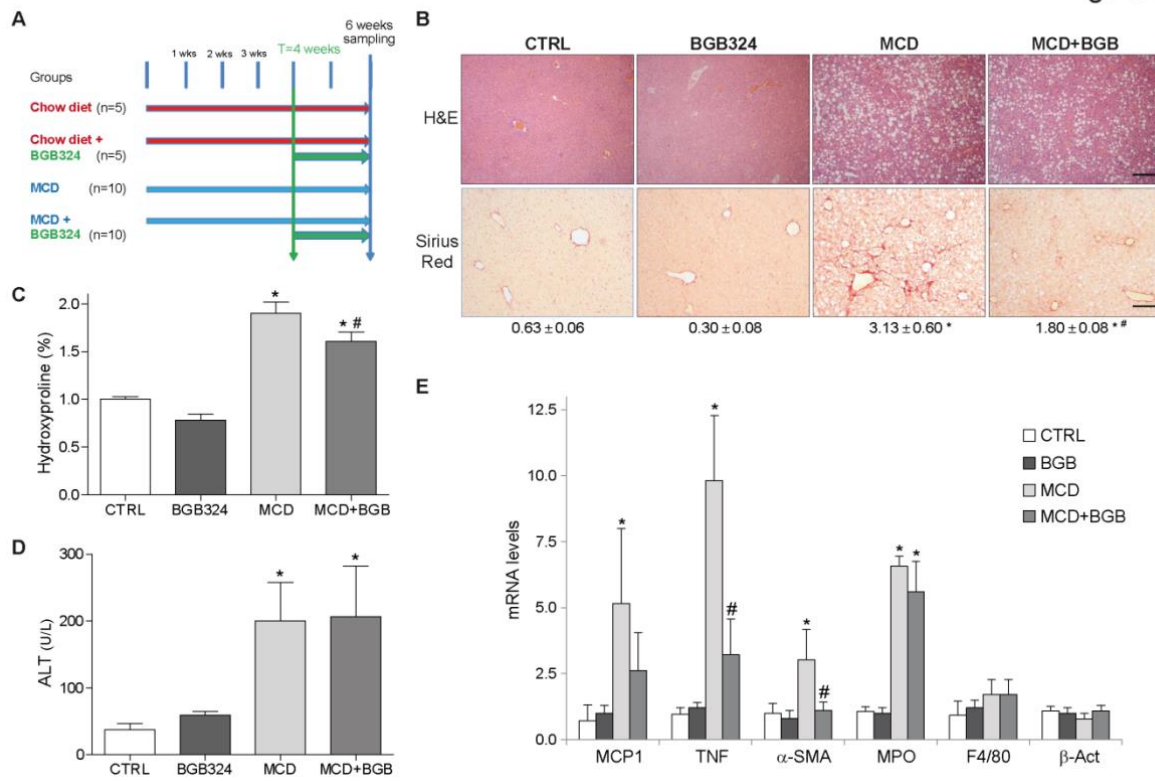


Figure 2. AXL inhibition reduced liver fibrosis and inflammation in MCD-fed mice. **A**, Diagram summarizing treatment schedule. **B**, Representative images of liver sections after H&E and Sirius Red staining; bar (200 μm). Sirius Red quantifications using Image J software in six random sections from each animal are shown below the respective pictures. **C**, Collagen determination by hydroxyproline quantification in liver samples and **D**, ALT serum levels from treated mice. **E**, mRNA expression level of MCP-1, TNF, α-SMA, MPO, F4/80 and β-actin in liver samples from treated mice. *, P≤0.05 vs. control mice, #, P≤0.05 vs. MCD-fed mice. Student's t test.

Figure 3

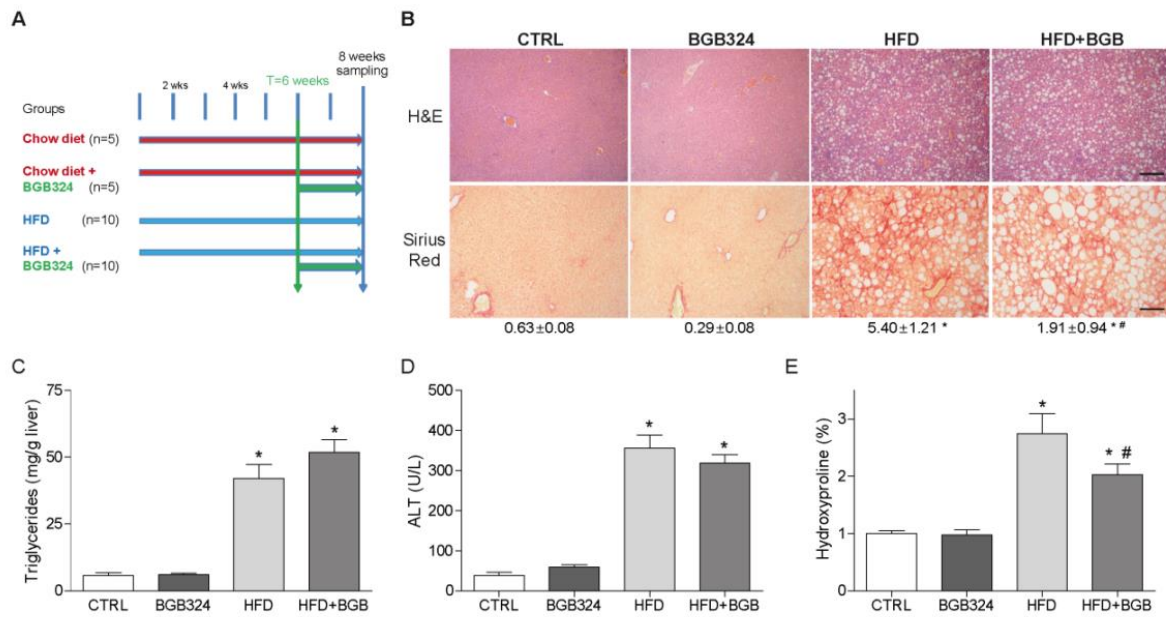


Figure 3. AXL inhibition reduced liver fibrosis and inflammation in HFD-fed mice. A, Diagram summarizing treatment schedule. B, Representative images of liver sections after H&E and Sirius Red staining; bar (200 μ m). Sirius Red quantification using ImageJ software in six random sections from each animal are shown below the respective pictures. C, Triglyceride levels in liver extracts; D, ALT serum levels from treated mice and E, collagen determination by hydroxyproline quantification in liver samples from treated mice. *, $P \leq 0.05$ vs. control mice, #, $P \leq 0.05$ vs. HFD-fed mice. Student's t test.

Figure 4

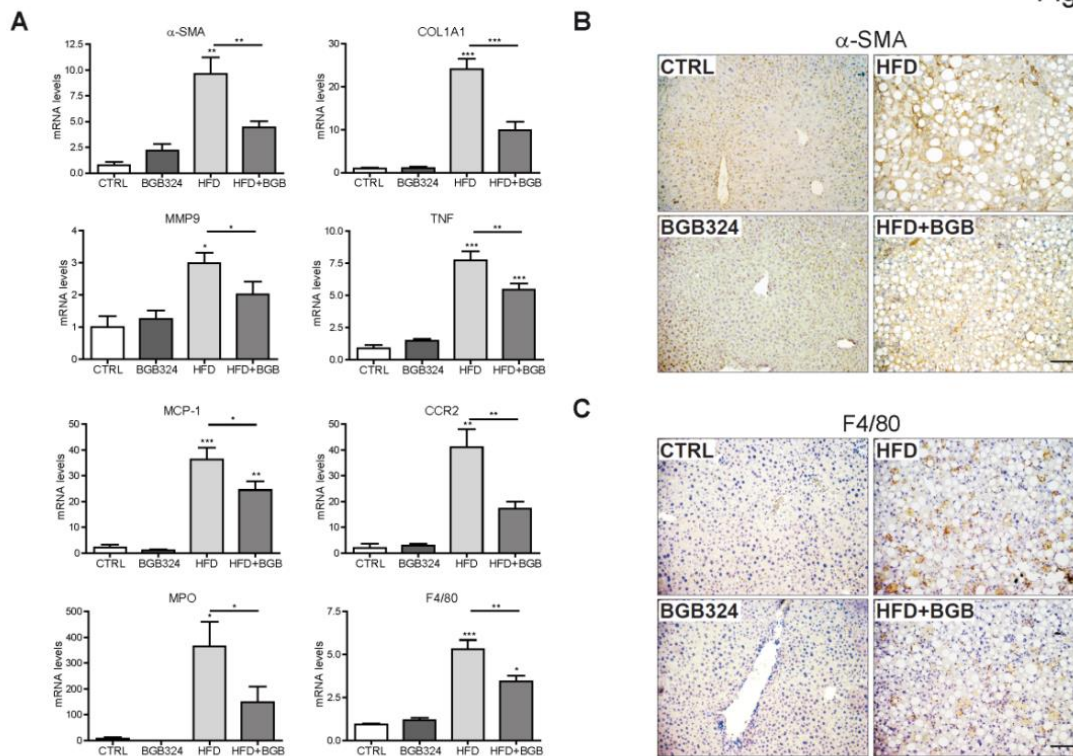


Figure 4. Reduction of pro-fibrotic and pro-inflammatory gene and protein expression by bemcentinib administration to HFD-fed mice. A, mRNA expression level of α -SMA, COLIA1, MMP9, TNF, MCP1, MPO and F4/80 were measured in liver samples from animals receiving chow or NASH-inducing diet with or without administration of AXL inhibitor bemcentinib. B-C, Representative images of liver IHC of α -SMA and F4/80 expression in mice treated as above; bar (100 μ m). *, $P \leq 0.05$ vs. control mice, #, $P \leq 0.05$ vs. HFD-fed mice. Student's t test.

Figure 5

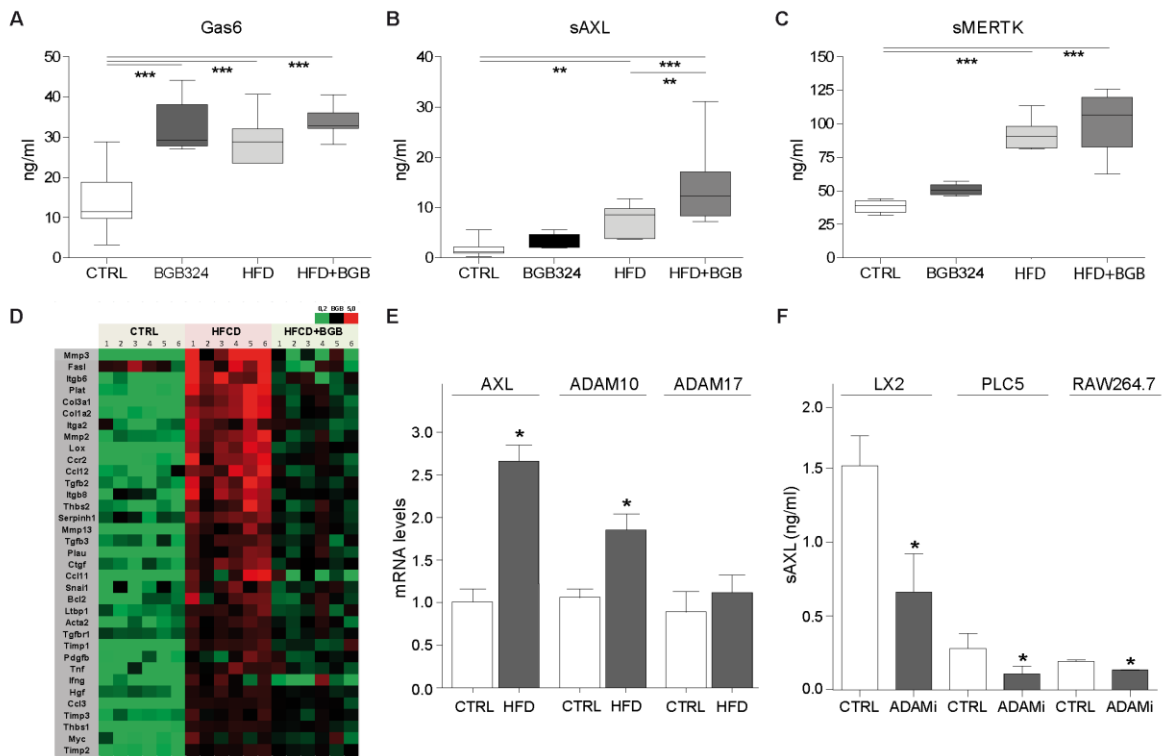


Figure 5. Increased serum sAXL in diet-induced NASH as consequence of metalloproteinase ADAM10 and AXL upregulation. A-C, Serum GAS6, sAXL and MERTK levels were measured in mice fed with chow diet and HFD gavaged with vehicle or bemcentinib. *, $P \leq 0.05$, **, $P \leq 0.01$ and ***, $P \leq 0.001$ between groups. 1-way ANOVA, Newman-Keuls Multiple Comparison Test. D, Analysis of AXL inhibition in HFD-fed mice using an mRNA Array containing fibrosis- and inflammation-related genes. E, Expression changes of AXL, ADAM 10 and ADAM 17 in HFD-fed mice. *, $P \leq 0.05$ vs. control mice. Student's t test. F, Levels of sAXL secreted from different cell lines in the presence or absence of ADAM10 inhibitor (GI254023X). *, $P \leq 0.05$ vs. untreated cells. Student's t test.

Figure 6

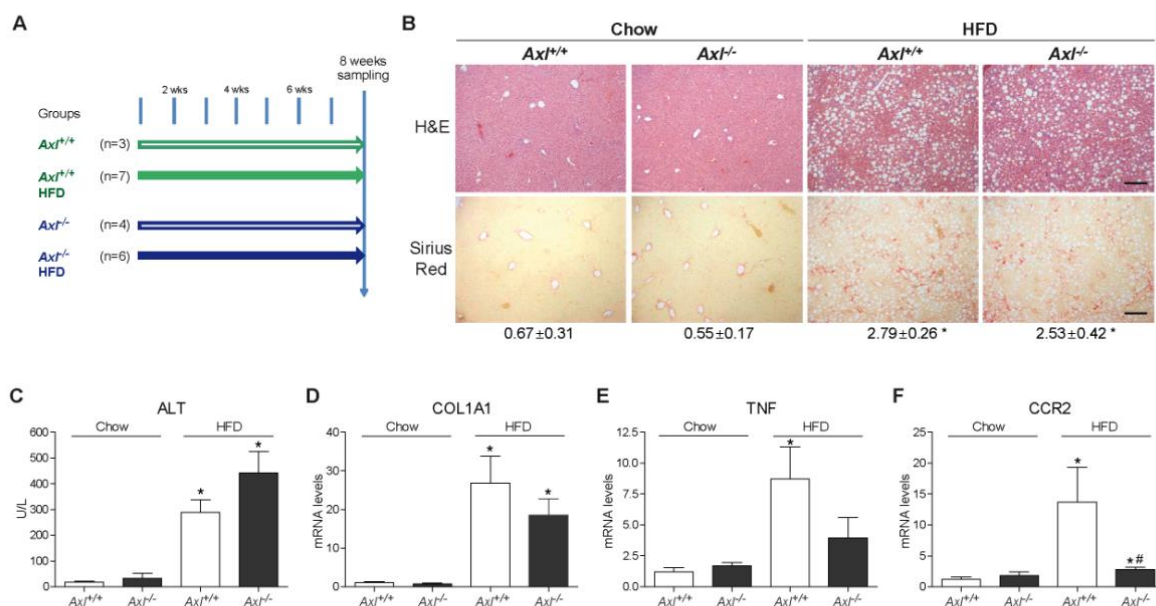


Figure 6. AXL deficient mice display partial protection after HFD feeding. A, Diagram summarizing treatment schedule. B, Representative images of liver sections after H&E and Sirius Red staining; bar (200 μ m). Sirius Red quantification using Image J software in six random sections from each animal is shown below the respective pictures. C, ALT serum levels from treated mice. D-F, mRNA expression level of COL1A1, TNF and CCR2 in liver samples from treated mice. *, $P \leq 0.05$ vs. control mice. #, $P \leq 0.05$ vs. HFD-fed mice. Student's t test.

Figure 7

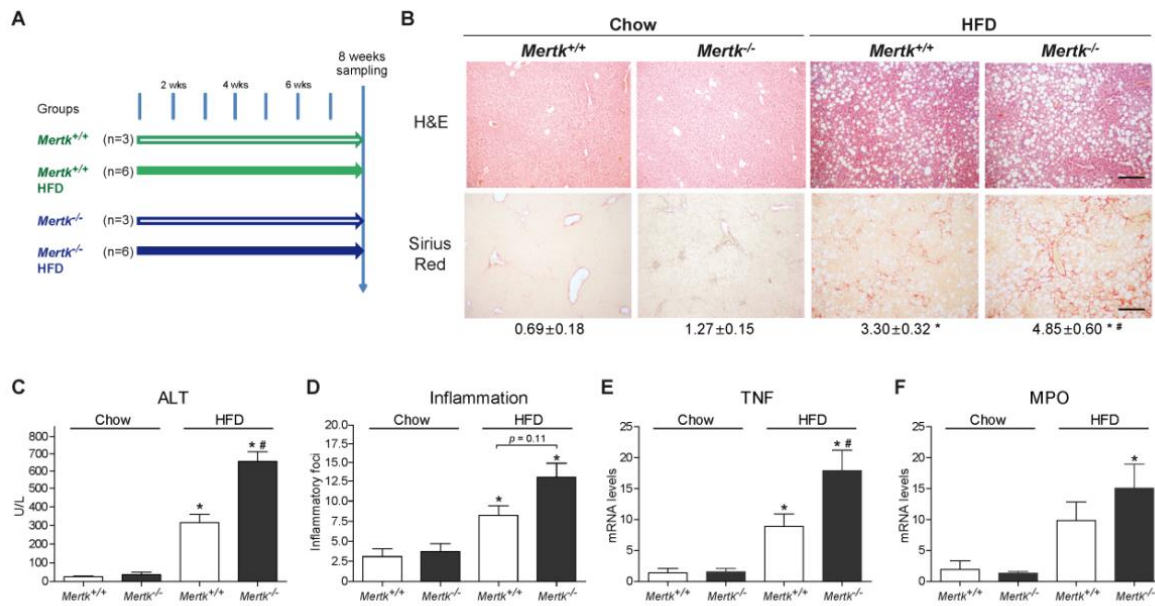


Figure 7. MERTK deficiency increased liver fibrosis and inflammation in HFD-fed mice. A, Diagram summarizing treatment schedule. B, Representative images of liver sections after H&E and Sirius Red staining; bar (200 μ m). Sirius Red quantification using Image J software in six random sections from each animal. C, ALT serum levels from treated mice. D, Quantification of the number of inflammatory foci in H&E slides (5 fields / animal) from treated mice. E-F, mRNA expression level of TNF and MPO in liver samples from treated mice. *, $P \leq 0.05$ vs. control mice, #, $P \leq 0.05$ vs. HFD-fed mice. Student's t test.

Figure 8

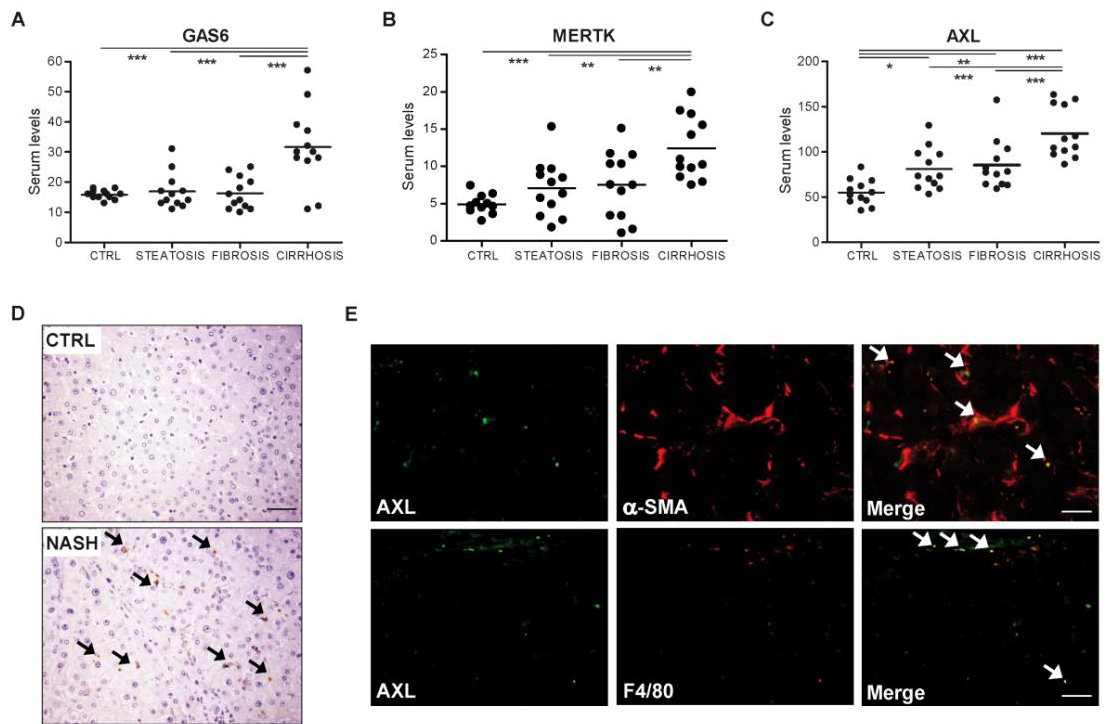
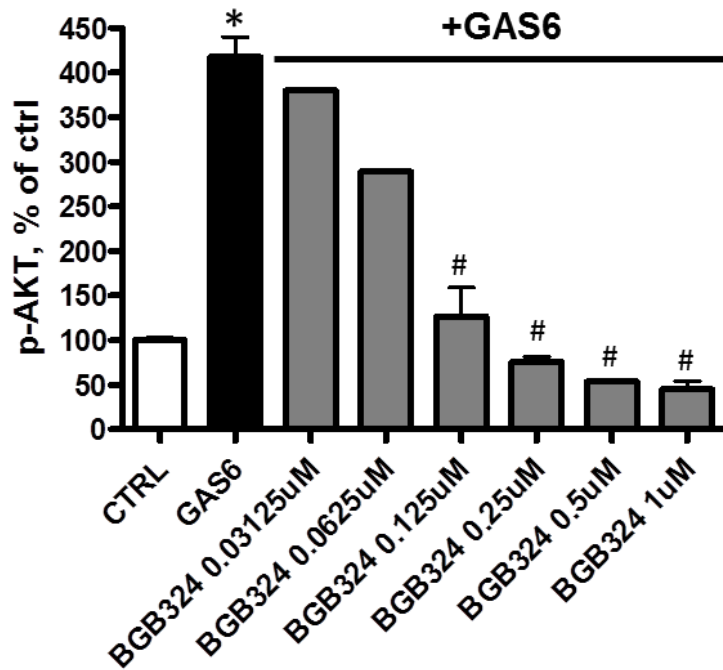
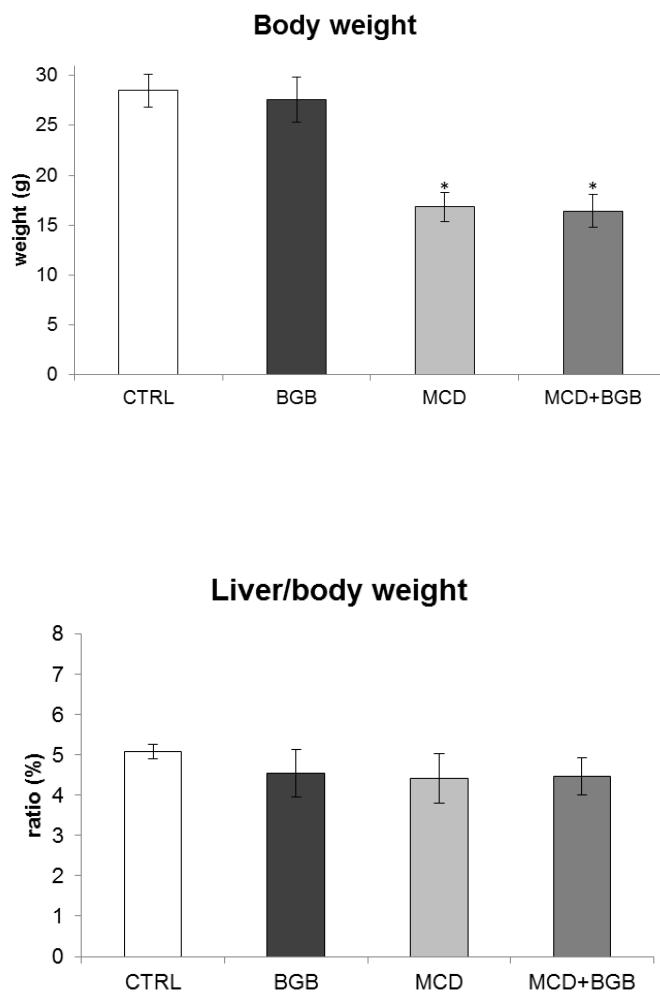


Figure 8. Serum levels of sAXL are increased in NASH patients being expressed in activated HSCs and Kupffer cells. A-C, GAS6 and soluble levels of AXL and MERTK (ng/μl) were measured in control individuals (n=12) and in patients with different degree of NASH progression: with steatosis (n=12), fibrosis (n=12) and cirrhosis (n=12). *, $P \leq 0.05$, **, $P \leq 0.01$ and ***, $P \leq 0.001$ between groups. 1-way ANOVA, Newman-Keuls Multiple Comparison Test. D, Representative images of liver IHC of AXL expression in control and cirrhotic NASH patients; bar (50 μm). E, Representative immunofluorescence images of AXL (green) and α-SMA/F480 (red) in cirrhotic NASH patients.

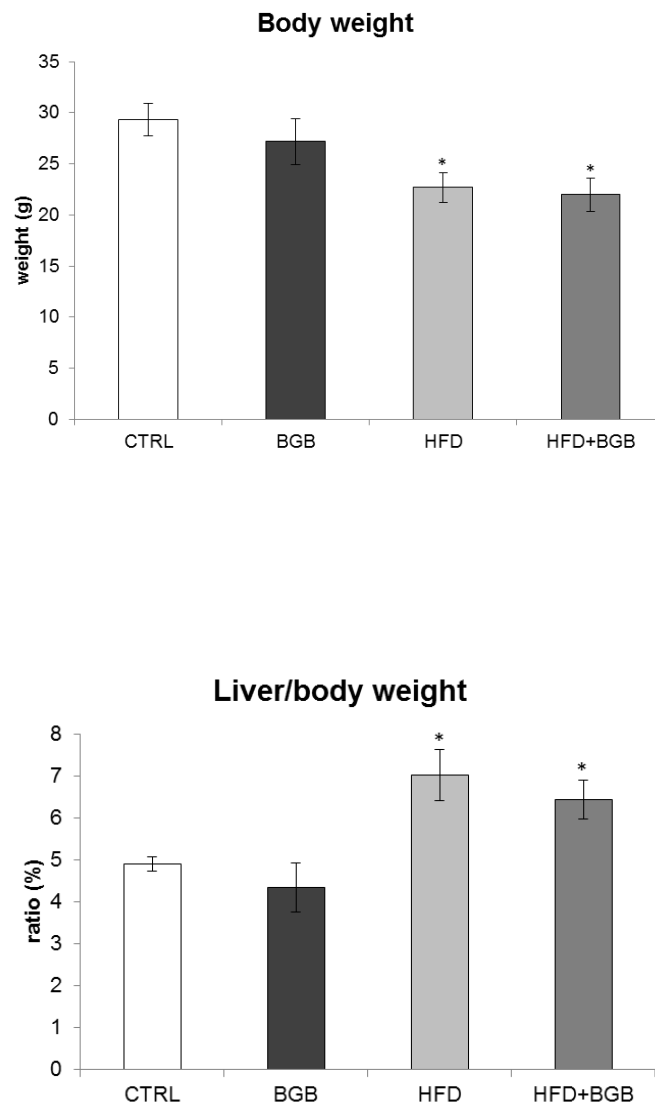
SUPPLEMENTAL FIGURES:



Suppl. Figure 1. ELISA of p-AKT showing the dose-response effect of bemcentinib on GAS6-dependent AKT phosphorylation. LX2 cells were seeded in DMEM+10%FBS and kept overnight. The day after, LX2 cells were washed and left in starvation medium (DMEM+0%FBS) for 6h before preincubation with BGB324 (0-1 μ M) followed by GAS6-activating complex (1 μ g/ml) for 15min. Data is shown as media \pm S.D., n=2, *p<0.05 vs. control, #p<0.05 vs. GAS6.



Suppl. Figure 2. Body weight and liver/body weight ratio in MCD study. Body and liver weight were measured after sacrifice for mice fed for 6 weeks with chow and MCD diet that received vehicle or bemcentinib (BGB324) gavages for the last 2 weeks. Data is shown as media±S.D., n=4-5,*p<0.05 vs. control.



Suppl. Figure 3. Body weight and liver/body weight ratio in HFD study. Body and liver weight were measured after sacrifice of mice fed for 8 weeks with chow and HFD diet that received vehicle or bemcentinib (BGB324) gavages for the last 2 weeks. Data is shown as media±S.D., n=5-7,*p<0.05 vs. control.

Resultados 2: La actuación sobre la sobreexpresión de la glucosilceramida sintasa revierte la resistencia en modelos animales de carcinoma hepatocelular.

Stefanovic M; **Tutusaus A**; Martínez-Nieto GA; Bárcena C; de Gregorio E; Moutinho C; Barbero-Camps E; Villanueva A; Colell A; Marí M; García-Ruiz C; Fernández-Checa JC; Morales A. **Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma**. *Oncotarget*. 2016.

La relación entre los esfingolípidos y la quimioterapia ha sido objeto de estudio en múltiples tipos de cáncer. En CHC, al analizar las alteraciones en el metabolismo de esfingolípidos inducidas por el sorafenib, se observa *in vitro* un aumento de la expresión génica de enzimas relacionados con la producción de ceramida por hidrólisis de esfingomielina (ASMasa) o por síntesis *de novo* (CerS2). Esta sobreexpresión se refleja en un incremento rápido, dosis dependiente, de los niveles de ceramida tras el tratamiento de células de hepatoma con sorafenib. La inhibición de ASMasa, pero no de la síntesis *de novo*, reduce el efecto citotóxico del sorafenib, indicando que el aumento de ceramidas por el sorafenib es consecuencia de una mayor hidrólisis de esfingomielina como ocurre con otros quimioterapéuticos.

Por otro lado, el sorafenib induce también un aumento de los niveles de ARNm de enzimas que metabolizan la ceramida como la glucosilceramida sintasa (GCS), la ceramidasa ácida (ACDasa), y la esfingosina quinasa (SK1). Como estas enzimas producen esfingolípidos menos tóxicos, se examina el efecto de su inhibición para promover la acumulación de ceramida. En las células Hep3B, la inhibición de la ACDasa con NOE (N-Oleylethanolamine) y la de GCS con PDMP (N-[2-hydroxy-1-(4-morpholinylmethyl)-2-phenylethyl]-decanamide) potencian la muerte inducida por sorafenib, aunque en la línea HepG2 sólo se observan resultados significativos con PDMP. Al analizar los niveles de ceramida, se observa un aumento mayor con PDMP en las Hep3B tras la estimulación con sorafenib. De hecho, el sorafenib induce únicamente la actividad de la GCS y no la de la ACDasa. Para confirmar estos resultados, se transfectaron células de hepatoma con ARN de interferencia para reducir la expresión de GCS y ACDasa. Únicamente la reducción de la expresión de GCS aumenta la toxicidad del sorafenib en HepG2 y Hep3B indicando que el bloqueo de la eliminación de ceramida mediante la GCS y no ACDasa potencia el efecto citotóxico del sorafenib. Estos resultados señalan esta enzima como una diana terapéutica para el tratamiento del CHC.

Para corroborar esta nueva estrategia terapéutica *in vivo*, se trataron animales con tumores subcutáneos de HepG2 con PDMP sólo o en combinación con sorafenib. Esta combinación reduce significativamente el crecimiento tumoral respecto a los animales tratados con sorafenib, mientras que los que sólo recibieron PDMP presentan un crecimiento tumoral idéntico al grupo control. A nivel histológico, se observa también una disminución de la proliferación celular mediante IHQ de PCNA así como una menor vascularización mediante el marcaje por CD34 en los animales que recibieron el sorafenib junto al PDMP.

Una vez determinada la eficacia de la combinación, se estudiaron los mecanismos por los que el PDMP potencia la toxicidad del sorafenib. El sorafenib como inhibidor multiquinasa produce una disminución de la fosforilación de proteínas como ERK o AKT pero no se observa ningún cambio en esta disminución en presencia de PDMP. En cambio, sí se observan cambios en marcadores de autofagia en presencia de PDMP como la reducción de los niveles proteicos de LC3 y p62 así como un mayor número de punteados de LC3, indicador de la formación de autofagosomas, en las células de hepatoma tratadas con la combinación. Tanto las ceramidas como el sorafenib se han relacionado con la autofagia, sin embargo ésta puede inducir o proteger de la muerte celular. Para determinar la función de la autofagia, se analizó la viabilidad celular en presencia de un inhibidor de autofagia, 3-

methyladenine (3-MA). Este inhibidor reduce la viabilidad de las células de hepatoma tratadas con PDMP y sorafenib, por lo que este inhibidor induce autofagia como mecanismo de protección.

Descartada la autofagia, se investigaron otros mecanismos de acción del PDMP relacionados con el daño mitocondrial. Como otros grupos ya han descrito, el sorafenib induce la producción del ROS así como la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria; sin embargo, el PDMP no potenció significativamente ninguno de estos eventos. Por otro lado, determinamos la polarización de la membrana mitocondrial mediante la sonda JC-1. El sorafenib produce una potente y rápida despolarización de la membrana mitocondrial que tampoco variaba en presencia de PDMP. En cambio, el PDMP en combinación con el sorafenib sí que indujo la salida del citocromo c al citosol a tiempos cortos. Este proceso de MOMP sin embargo no conduce a una apoptosis clásica puesto que el PDMP no induce la actividad de la caspasa 3 en células Hep3B tratadas con sorafenib. Esta muerte independiente de caspasa se ratifica en ensayos de MTT con el inhibidor de caspasa ZVAD que no varía la viabilidad de las células tratadas con sorafenib y PDMP. La permeabilización de la membrana también puede inducir una pérdida de actividad de complejos de la cadena respiratoria, así que para estudiar la funcionalidad mitocondrial, se evaluaron los niveles de ATP. Ni el sorafenib ni el PDMP produjeron cambios en ATP pero su combinación indujo una caída de los niveles de ATP. Estos cambios no son causados por un menor número de mitocondrias ya que el ratio de ADN mitocondrial y ADN nuclear no varía en ningún tratamiento. Por lo tanto, el PDMP sensibiliza las células tratadas con sorafenib mediante un colapso energético y de manera independiente a la actividad de las caspasas.

La principal limitación del sorafenib es la generación de resistencia. Para estudiar el papel de la GCS en la resistencia a sorafenib, se generaron, mediante una exposición continua a largo plazo, células Hep3B y HepG2 resistentes a sorafenib. Estas líneas resistentes sobreexpresan GCS respecto a las células sensibles. Para comprobar que esta sobreexpresión está relacionada con la resistencia a sorafenib, tratamos estas células con PDMP observando que se sensibilizan a sorafenib. Esta reversión también ocurre en modelos *in vivo* obtenidos tras la inoculación de estas células resistentes en ratones inmunocomprometidos. Para confirmar la relación entre GCS y la resistencia, se transfectaron células Hep3B con un vector de GCS. Las células Hep3B que sobreexpresan este enzima son menos sensibles a la toxicidad del sorafenib.

Por lo tanto, la sobreexpresión de la GCS contribuye a la ineficacia del sorafenib en el tratamiento del CHC avanzado, reivindicándose como una posible diana terapéutica cuya inhibición favorece el efecto antitumoral del sorafenib en células sensibles y resistentes *in vitro* e *in vivo*.

Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma

Milica Stefanovic¹, Anna Tutusaus¹, Guillermo A. Martinez-Nieto¹, Cristina Bárcena¹, Estefania de Gregorio¹, Catia Moutinho², Elisabet Barbero-Camps¹, Alberto Villanueva³, Anna Colell¹, Montserrat Marí¹, Carmen García-Ruiz^{1,4}, Jose C. Fernandez-Checa^{1,4,5}, Albert Morales¹

¹Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Catalonia, Spain

²Cancer Epigenetics and Biology Program (PEBC), Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, Catalonia, Spain

³Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology - Bellvitge Biomedical Research Institute, Barcelona, Catalonia, Spain

⁴Liver Unit, Hospital Clinic, CIBEREHD, Barcelona, Catalonia, Spain

⁵Research Center for Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Correspondence to: Albert Morales, **e-mail:** amorales@clinic.ub.es

Jose C. Fernandez-Checa, **e-mail:** checa229@yahoo.com

Keywords: liver cancer, chemotherapy, mitochondria, ceramide, mouse model

Received: July 27, 2015

Accepted: January 13, 2016

Published: January 22, 2016

ABSTRACT

Evasive mechanisms triggered by the tyrosine kinase inhibitor sorafenib reduce its efficacy in hepatocellular carcinoma (HCC) treatment. Drug-resistant cancer cells frequently exhibit sphingolipid dysregulation, reducing chemotherapeutic cytotoxicity via the induction of ceramide-degrading enzymes. However, the role of ceramide in sorafenib therapy and resistance in HCC has not been clearly established. Our data reveals that ceramide-modifying enzymes, particularly glucosylceramide synthase (GCS), are upregulated during sorafenib treatment in hepatoma cells (HepG2 and Hep3B), and more importantly, in sorafenib-resistant cell lines. GCS silencing or pharmacological GCS inhibition sensitized hepatoma cells to sorafenib exposure. GCS inhibition, combined with sorafenib, triggered cytochrome c release and ATP depletion in sorafenib-treated hepatoma cells, leading to mitochondrial cell death after energetic collapse. Conversely, genetic GCS overexpression increased sorafenib resistance. Of interest, GCS inhibition improved sorafenib effectiveness in a xenograft mouse model, recovering drug sensitivity of sorafenib-resistant tumors in mice. In conclusion, our results reveal GCS induction as a mechanism of sorafenib resistance, suggesting that GCS targeting may be a novel strategy to increase sorafenib efficacy in HCC management, and point to target the mitochondria as the subcellular location where sorafenib therapy could be potentiated.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common liver cancer and the end stage of chronic liver disease [1]. Its prevalence is expected to rise due to the escalating increase of non-alcoholic fatty liver disease associated to obesity and metabolic syndrome, and the

incidence of HCV [2, 3]. HCC is often diagnosed in an advanced stage characterized by resistance to current therapy, when curative strategies are no longer applicable. The establishment of the multikinase inhibitor sorafenib as the standard of care has opened a window of hope for HCC patients with very poor prognosis [3]. However, this promising systemic treatment has limited survival

Table 1: mRNA levels of main sphingolipidic enzymes in Hep3B cells after sorafenib exposure

Sorafenib (μM)	0	2.5	5	10
ASMase	1.00 \pm 0.32	2.05 \pm 0.66 *	2.39 \pm 0.22 *	1.53 \pm 0.60
NSMase	1.00 \pm 0.10	0.90 \pm 0.20	1.10 \pm 0.20	1.15 \pm 0.15
ACDase	1.00 \pm 0.07	2.07 \pm 0.59 *	2.70 \pm 0.37 *	1.33 \pm 0.56
NCDase	1.00 \pm 0.11	0.85 \pm 0.16	0.95 \pm 0.23	1.05 \pm 0.20
CerS2	1.00 \pm 0.35	1.63 \pm 0.54	1.85 \pm 0.70	2.65 \pm 0.69 *
CerS4	1.00 \pm 0.21	1.10 \pm 0.09	1.20 \pm 0.29	1.30 \pm 0.18
GCS	1.00 \pm 0.09	1.65 \pm 0.73	2.46 \pm 0.34 *	4.01 \pm 0.69 *
SPT	1.00 \pm 0.13	1.59 \pm 0.54	2.10 \pm 0.33 *	1.97 \pm 0.59 *
SK1	1.00 \pm 0.37	1.40 \pm 0.35	1.64 \pm 0.45	0.77 \pm 0.51

Hep3B cells were exposed to increasing doses of sorafenib (2.5, 5, 10 μM) for 16 hours and main enzymes in ceramide metabolism analyzed by RT-PCR. (n=3). *, p<0.05 vs. control.

benefits with low rates of tumor response, probably due to the existence of primary and acquired drug resistance mechanisms [4, 5]. Several drugs are now in the pipeline for HCC application, either alone or in combination with sorafenib, but the lack of positive results complicates their clinical application. Additionally, effective therapy combinations may reveal novel targets of treatment for HCC [4–6].

Ceramide is a bioactive sphingolipid generated in response to a wide range of stimuli, including chemotherapeutic agents, which triggers cell death [7]. Transient or sustained ceramide generation (Suppl. Fig. 1), either by sphingomyelinases activation or *de novo* synthesis, respectively [7, 8], can be limited by the concurrent activation of ceramide-degrading enzymes, which reduce the efficacy of drug therapy on tumor cells [8, 9]. For instance, glucosylceramide synthase (GCS) catalyzes the generation of glucosylceramide from ceramide while ceramidases (CDases) deacylate ceramide to sphingosine, which is then phosphorylated to sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinases. Both pathways have been characterized in drug-resistance as protective mechanisms triggered by tumor cells after cancer treatment [8, 10, 11]. In liver cancer, increasing intratumoral ceramide levels with nanoliposomal administration has been used as a strategy in the treatment of HCC [12], while targeting acid CDase (ACDase) potentiated the cytotoxic effect of daunorubicin in hepatoma cells [13]. Regarding sorafenib action, recent data has shown the efficacy of combining sorafenib with recombinant acid sphingomyelinase, a ceramide-generating enzyme, in experimental liver cancer [14], or with nanoliposomal ceramide in melanoma or breast cancer [15]. These findings have proposed a role for sphingolipids in sorafenib toxicity [16], but a detailed analysis of ceramide metabolism *in vitro* and *in vivo* HCC models after sorafenib treatment has not been previously reported.

Our data indicate that, although sorafenib alters the sphingolipidic metabolism in hepatoma cells via ASMase activation, ceramide toxicity is partially reduced by the simultaneous induction of ceramide-eliminating enzymes, in particular GCS. Moreover, pharmacological or genetic GCS antagonism sensitized hepatoma cells to sorafenib by a caspase-independent mitochondrial-dependent mechanism. Moreover, GCS is upregulated in resistant hepatoma cells after long-term exposure to sorafenib, pointing to GCS targeting as an effective approach to re-sensitize tumor cells to sorafenib. Therefore, our results validate the interest of ceramide-focused strategies to increase sorafenib effectiveness in HCC and confirm mitochondria as the subcellular site responsible for these effects.

RESULTS

Sorafenib increases ceramide levels and the expression of enzymes involved in ceramide metabolism in Hep3B cells

Despite several evidences showing the influence of ceramide-related compounds in sorafenib efficacy [14, 15], the effect of sorafenib on ceramide metabolism has not been evaluated. Among critical sphingolipidic genes (Suppl. Fig. 1), we found that overnight sorafenib exposure increased expression of genes responsible for ceramide production (Table 1) by sphingomyelin hydrolysis (acid sphingomyelinase, ASMase) or *de novo* synthesis (serine palmitoyl transferase, SPT, ceramide synthase 2, CerS2). In parallel, genes involved in ceramide modification via ceramidase degradation (acid ceramidase, ACDase, and sphingosine kinase 1, SK1) or glycosylation (glucosylceramide synthase, GCS) were also increased. Moreover, in another hepatoma cell line, HepG2, sorafenib also increased ceramide formation through ASMase and glycosylation via GCS (Suppl. Table 1).

Rapid changes in ceramide concentration due to ionizing radiation or chemotherapeutic agents are induced by ASMase stimulation, while sustained ceramide increase via *de novo* synthesis occurs through activation of ceramide synthases, such as CerS2 and CerS4, which exhibit predominant liver expression [20, 21]. Time-response analysis in Hep3B cells showed both increases (Figure 1A), in ASMase and in *de novo* ceramide synthesis (SPT and CerS2). Moreover, sorafenib induced the expression of GCS and ACDase, which metabolize ceramide, as well as SK1. These effects were accompanied by changes in ceramide levels upon sorafenib treatment. Ceramide increased dose-dependently, being significant for all doses (from 2.5 to 20 μ M) after 4 h of sorafenib exposure (Figure 1B).

Pharmacologic inhibition of sphingolipid enzymes modulates sorafenib-induced toxicity in hepatoma cells

To examine the role of the ceramide production/degradation pathways in sorafenib cytotoxicity, we administered sphingolipid inhibitors combined with sorafenib in hepatoma cells (Suppl. Fig. 1). First, we used myriocin (MYR, 5 μ M), which targets ceramide *de novo* biosynthesis by inhibiting SPT; and imipramine (IMIP, 15 μ M), tricyclic antidepressant and effective ASMase inhibitor [22], to block ceramide generation

from the sphingomyelin pathway, at doses that caused no effect in hepatoma cell growing. Imipramine reduced significantly sorafenib-induced cell death (Figure 1C), while myriocin (Figure 1D) or fumonisins B1 (FB1) (data not shown), another blocker of the *de novo* pathway [22], caused no effect in sorafenib action, further confirming a contributory role of ASMase activation in sorafenib toxicity [14].

To examine if forcing ceramide accumulation could increase sorafenib cytotoxicity *in vitro*, we tested cell viability after inhibition of ACDase with NOE (Figure 2A), or GCS with PDMP in sorafenib-treated Hep3B cells (Figure 2B). Cell death was augmented significantly upon inhibition of GCS and ACDase, and similar effects were observed with PDMP but not NOE in sorafenib-exposed HepG2 cells (Suppl. Fig. 2). Of note, neither PDMP nor NOE alone caused damage to primary mouse hepatocytes as previously reported [13, 18], having no significant effect on sorafenib toxicity in normal hepatocytes (data not shown). Moreover, changes in ceramide content after inhibition of ACDase with NOE or GCS with PDMP were confirmed in sorafenib-treated Hep3B cells (Figure 2C). Remarkably, GCS inhibition was more effective increasing ceramide levels after sorafenib exposure, in line with greater sorafenib toxicity induced by PDMP, and further demonstrating the upregulation of ceramide metabolism after sorafenib exposure. Interestingly, we detected GCS but not in ACDase induction by sorafenib

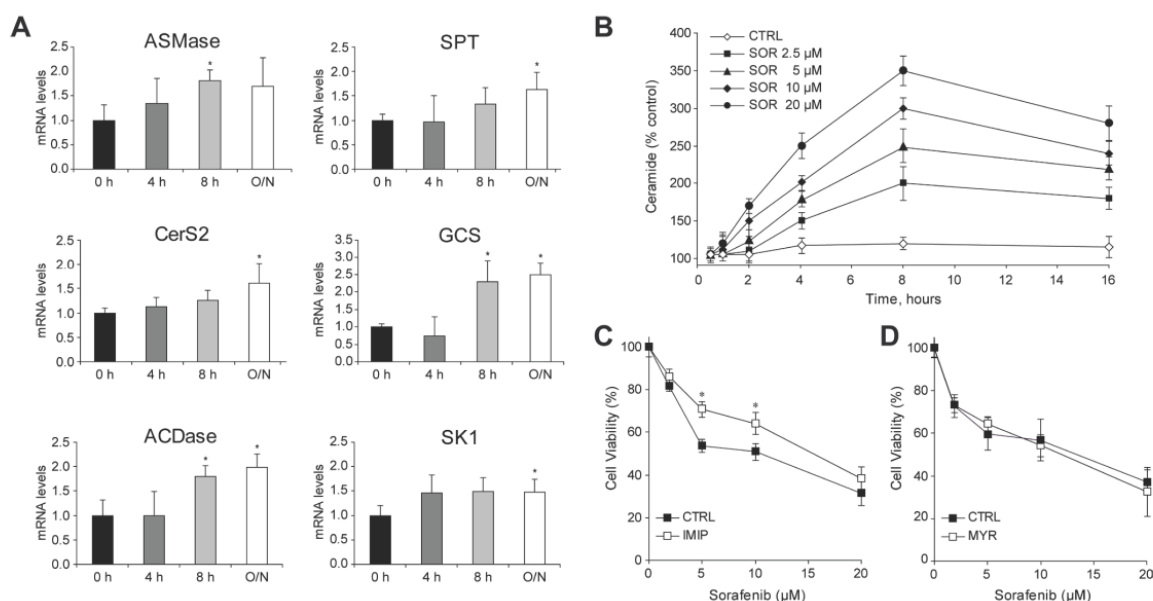


Figure 1: Sorafenib administration to hepatoma cells induces changes in ceramide metabolism. A. Time-course analysis of mRNA levels of main sphingolipidic enzymes in Hep3B cells exposed to sorafenib (5 μ M). B. Ceramide levels were quantified in Hep3B cells treated with increased doses of SOR (2.5, 5, 10 and 20 μ M) during different times of incubation, after lipid extraction, TLC running and PhosphoImager quantification. C. and D. Cell viability of Hep3B cells, preincubated (30 min) with imipramine (IMIP, 15 μ M) or myriocin (MYR, 5 μ M), and treated with sorafenib for 16 h. (n=3). *, p<0.05 vs. control.

(Figure 2D) in Hep3B cells, despite of increased ACDase (Figure 1A). These results were confirmed by western blot in samples from Hep3B (Figure 2E) and in HepG2 cells (Figure 2F), paralleling the increase seen at the mRNA levels of GCS in both hepatoma cell lines after sorafenib addition. Therefore, our results indicated that the blockage of ceramide-modifying enzymes, particularly GCS, potentiates ceramide contribution to sorafenib toxicity.

GCS silencing potentiates sorafenib-induced toxicity in hepatoma cells

To further verify the contribution of ceramide in sorafenib cytotoxicity, hepatoma cells were transfected with siRNAs against GCS and ACDase analyzing sorafenib-induced cell death. GCS silencing in Hep3B cells, as detected by mRNA and protein levels (Figure 3A),

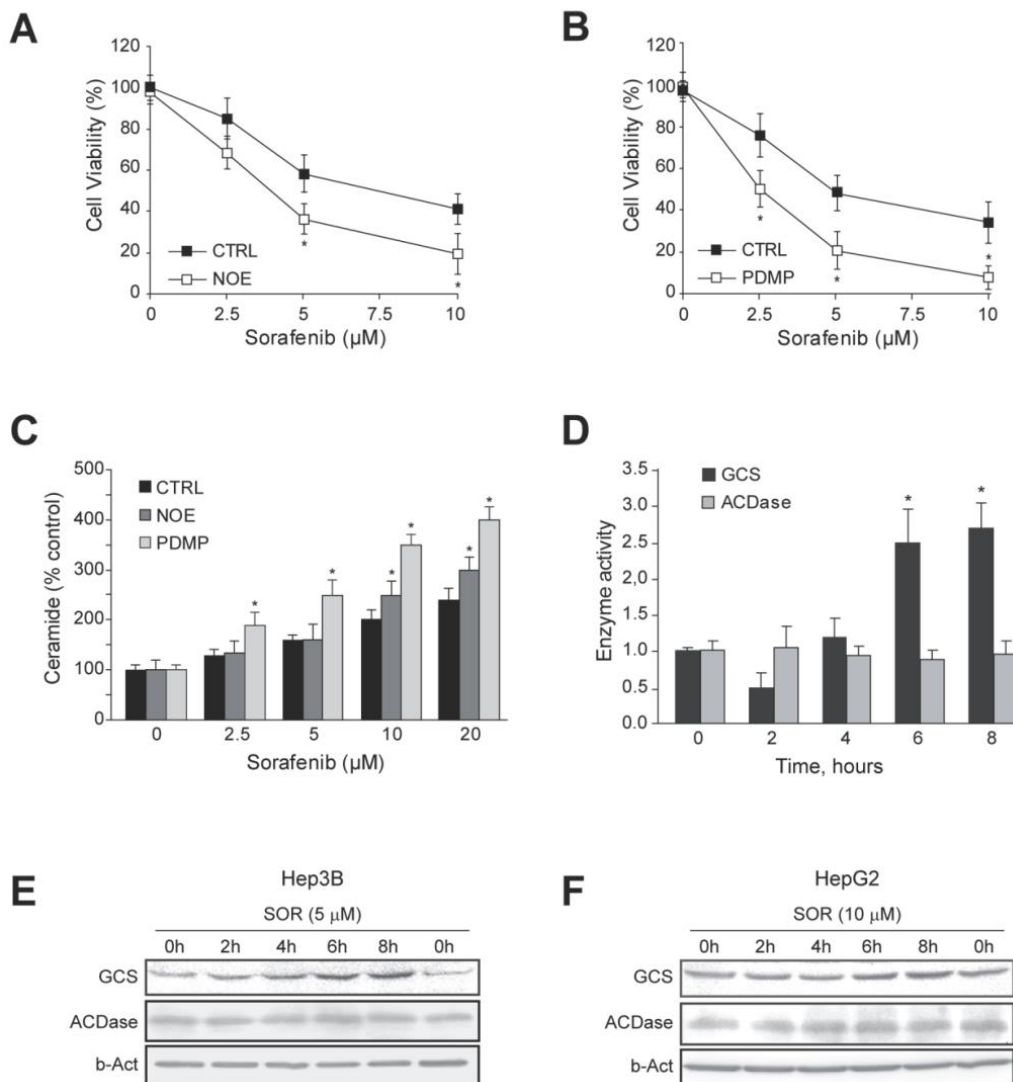


Figure 2: GCS is activated by sorafenib and GCS inhibition increases sorafenib toxicity in hepatoma cells. A. and B. Cell viability of Hep3B cells, preincubated (30 min) with NOE (100 µM) or PDMP (30 µM), and treated with sorafenib for 16 h. C. Ceramide levels were quantified in Hep3B cells, preincubated with NOE and PDMP, and sorafenib for 4h. D. Time-course analysis of GCS and ACDase activities were analyzed in Hep3B cells treated with sorafenib (10 µM). E. and F. Hep3B and HepG2 cells, respectively, were treated with sorafenib and GCS protein levels measured at different times. *, p<0.05 vs. control cells. RNA interference was validated by qPCR and protein levels of GCS (E) and ACDase (F). Cell viability after sorafenib treatment was measured in GCS- and ACDase-silenced Hep3B cells, respectively, and compared to siCTRL-cells.

elicited increased sorafenib toxicity (Figure 3B). Similarly, HepG2 cells transfected with GCS siRNA displayed higher sensitivity to sorafenib (Suppl. Fig. 3). However, ACDase silencing (Figure 3C), did not sensitize Hep3B cells sorafenib (Figure 3D), in discrepancy with the results observed after NOE inhibition, maybe suggesting NOE off-target effects. Moreover, silencing GCS in PLC cells, another hepatoma cell line, failed to sensitize to sorafenib toxicity (Suppl. Fig. 4), and this effect was accompanied by a modest reduction of GCS protein levels (30-40%). However, pharmacological inhibition of GCS with PDMP was highly effective in sensitizing PLC cells to sorafenib (Suppl. Fig. 5), although it required higher doses of PDMP compared to other hepatoma cell lines. Overall, our data suggest that blocking ceramide elimination via GCS reduction, rather than ACDase, improve sorafenib cytotoxicity in HCC cells, clearly pointing to GCS as the

sphingolipidic enzyme to pharmacologically target for sorafenib combined therapy.

GCS inhibition reduced tumor growth in subcutaneous HCC mouse model after sorafenib treatment

Before starting *in vivo* treatments, in order to replicate the findings of sensitization to sorafenib upon GCS inhibition/silencing seen with the MTT-based cell viability approach, crystal violet cell proliferation assay was used to measure the number of viable cells. After four days exposure, Hep3B and HepG2 cells treated with PDMP were clearly sensitized to sorafenib, diminishing cell survival after GCS inhibition (Figure 4A), reproducing in clonogenic assays the findings observed with the MTT assay. After that, we established bilateral

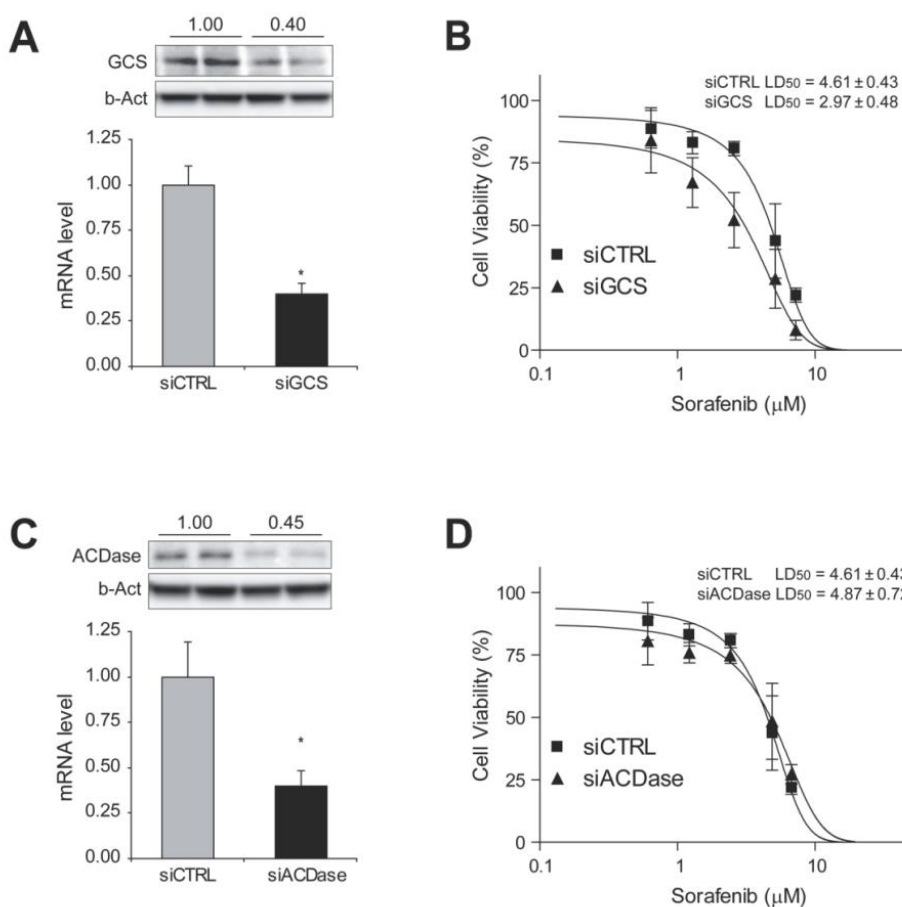


Figure 3: GCS silencing sensitizes hepatoma cells against sorafenib exposure. Hep3B cells were transfected with siRNA control and against GCS and ACDase. RNA interference was validated by qPCR and protein levels of GCS **A**, and ACDase **C**. Cell viability after sorafenib treatment was measured in GCS- and ACDase-silenced Hep3B cells (**B** and **D**, respectively) and compared to siCTRL cells. *, $p < 0.05$ vs. siCTRL cells.

xenograft tumors by injecting subcutaneously HepG2 cells in the flanks of nude mice. Once measurable tumors were established, animals received sorafenib or vehicle by oral gavage, with or without PDMP i.p administration. While sorafenib-treated mice exhibited reduced tumor growth, this effect was potentiated by PDMP treatment (Figure 4B). In addition, the sensitizing effect of GCS inhibition by PDMP was accompanied by reduced tumor cell proliferation, as denoted by PCNA detection (Figure 4C) and vascularization, as detected in CD34 stained slides (Figure 4C). Moreover, we performed TUNEL assay in our

samples to identify DNA fragmentation as consequence of the apoptotic cell death induced by the chemotherapeutic treatments (Figure 4C). Only few TUNEL positive cells were identified after sorafenib treatment, number that was slightly increased after PDMP co-treatment. In fact, the percentage of cells detected with fragmented nuclear DNA is low (under 1%), maybe suggesting that PDMP/sorafenib combination is not inducing classical apoptotic cell death. Of note, PDMP alone administration in mice did not modify tumor growth (Figure 4B), vessel formation (Figure 4C) or induce any hepatic damage

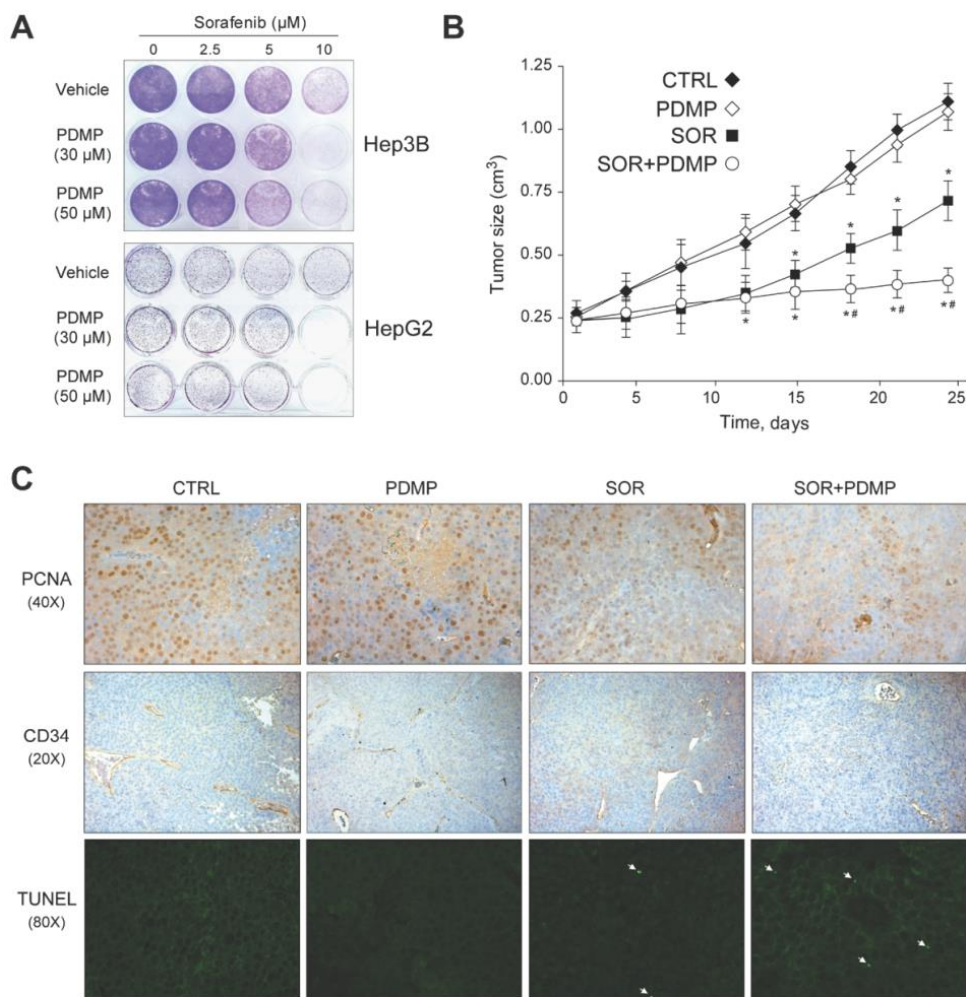


Figure 4: GCS inhibition reduces subcutaneous tumor growth in mouse. **A.** Hep3B (upper) and HepG2 (lower) cells were treated with PDMP (0, 30 and 50 μM) and sorafenib (0, 2.5, 5 and 10 μM) for 1 day, culture medium changed, and cells allowed to grow for three extra days. Crystal violet staining was performed to illustrate changes in colony formation and representative images taken. **B.** Mice bearing HepG2-subcutaneous tumors were i.p. injected with PDMP (60 mg/kg) and sorafenib given orally by gavage (80 mg/kg) daily for 3 weeks (CTRL, n=8; PDMP, n=6; SOR+PDMP, n=8). *, p<0.05 vs. vehicle-treated mice. #, p<0.05 vs. sorafenib-treated mice. **C.** Representative images of tumor samples stained for PCNA, CD34 and TUNEL detection.

to treated animals (data not shown). Therefore, GCS pharmacological inhibition was effective in increasing the efficacy of sorafenib therapy in mice bearing subcutaneous hepatoma tumors.

Effect of GCS inhibition on sorafenib-induced anti-proliferative effects and autophagy in hepatoma cells

We next explored potential mechanisms underlying the potentiation of SOR-induced cell death by GCS inhibition. Since the RAF/MEK/ERK pathway and PI3K/AKT activity are critical in the progression of HCC [23], we analyzed the impact of GCS inhibition with PDMP on these pathways. Following sorafenib exposure, pAKT and pERK decreased in a dose-dependent manner in Hep3B cells (Figure 5A). However, no additional changes on PI3K/AKT and RAF/MAPK/ERK signaling pathway were detected after GCS inhibition.

Ceramide accumulation [24] and sorafenib exposure [25] have been reported to promote autophagy. To determine if enhanced cytotoxic effect of combined therapy was associated with autophagic cell death, we treated hepatoma cell line Hep3B with sorafenib and tracked the conversion of LC3-I to the LC3-II form, as an autophagosome marker, and p62, which is ubiquitinated and degraded by the autolysosomes. Sorafenib induced a reduction in LC3-I that was accompanied by enhanced degradation of p62, consistent with an increase in autophagy after the treatment (Figure 5B). LC3-II accumulation was not evident, probably because LC3-II is also degraded by autophagy. The sorafenib/PDMP treatment resulted in decreased p62 levels compared to sorafenib alone suggesting that ceramide accumulation by PDMP potentiates sorafenib-induced autophagy, although not providing conclusive data. To further analyze this event, GFP-LC3 expressing Hep3B cells were cultured in the presence or absence of sorafenib and/or PDMP and the levels of punctate LC3-positive autophagosomes in cells were calculated in each condition [26]. As seen, sorafenib plus PDMP increased the number of LC3 positive dots, indicating enhanced autophagosome formation (Figure 5E) as denoted by the quantification of the percentage of cells with three or more autophagosomal puncta (Figure 5F).

Beclin 1 is a Bcl-2-homology domain 3 (BH3)-only protein required for the formation of the autophagosome, and Mcl1 is an anti-apoptotic Bcl-2 homolog that inhibits autophagy by "sequestering" Beclin 1 in a dimer [27]. Both proteins have a vital role in autophagy regulation in HCC cells [28]. Our data showed that sorafenib markedly decrease Mcl1 levels, and this effect is potentiated by PDMP (Figure 5B). In fact, Beclin 1/Mcl1 ratio increased from 1.0 in control cells to 2.8 in PDMP-sorafenib-treated cells, probably releasing Beclin 1 molecules to promote autophagy. In addition, we have tested for Bcl-2 and Bcl-xL levels after sorafenib treatment and have found no differences, at least at short-time incubation, which

contrasts with the sharp decline observed for Mcl-1 levels as soon as 2-4 hours of sorafenib exposure (data not shown).

Autophagy has a dual role in cancer cells either promoting survival by providing nutrients to proliferating cells or triggering cell death via lethal mitophagy [26]. Moreover, GCS inhibitors have been recently described as enhancers of autophagy flux in primary neurons [29]. To address whether sorafenib plus PDMP-induced autophagy is protective or toxic, we incubated sorafenib/PDMP-treated cells with 3-methyladenine (3-MA), inhibitor of autophagy initiation. We first tested different 3-MA concentrations to guarantee autophagy inhibition in the absence of cytotoxicity to hepatoma cells. After that, 3-MA-induced autophagy inhibition displayed small protection against sorafenib alone (Figure 5C), while cell death was clearly potentiated by 3-MA in the combined treatment (Figure 5D). Therefore, sorafenib/PDMP-induced autophagy induction seems to act as a protective mechanism, discarding autophagy-induced cell death as the mechanism triggered during PDMP/sorafenib toxicity.

GCS inhibition triggers mitochondrial-dependent cell death by sorafenib in hepatoma cells

Besides its involvement in autophagy regulation, Mcl1 is an antiapoptotic mitochondrial Bcl-2 member, suggesting that the sensitization of PDMP to sorafenib could involve apoptotic cell death. Mitochondrial damage results from sorafenib interaction with mitochondrial respiratory chain and reactive oxygen species (ROS) production [30]. Similarly, ceramide induces mitochondrial permeability after direct interaction with complex III of the respiratory system [31]. Moreover, sphingolipids, and particularly ceramide, promote changes in mitochondrial membrane composition favoring channel formation by Bcl-2 family members [32, 33]. Therefore, we evaluated the influence of GCS inhibition on ROS production and mitochondrial membrane potential (MMP) after sorafenib treatment. Hep3B cells were treated with sorafenib and/or PDMP and incubated for 30 minutes with DCF to determine ROS production and with JC-1 to estimate MMP. Sorafenib induced a rapid decline in MMP even at low doses, which was not modified by PDMP addition (Figure 6A). In fact, dissipation of MMP was complete in less than 30 minutes with sorafenib doses over 10 μ M (not shown here), while PDMP alone had no effect. In parallel, ROS induction caused by sorafenib was not potentiated by PDMP, as measured fluorimetrically by DCF (Figure 6B). In line with these observations, we addressed whether sorafenib-induced mitochondrial complex I inactivation, as observed in human neuroblastoma cells [30] is potentiated by sorafenib. Complex I activity decreased in sorafenib-treated hepatoma cells (around 50%), but PDMP co-addition did not significantly modify it (Suppl. Fig. 6).

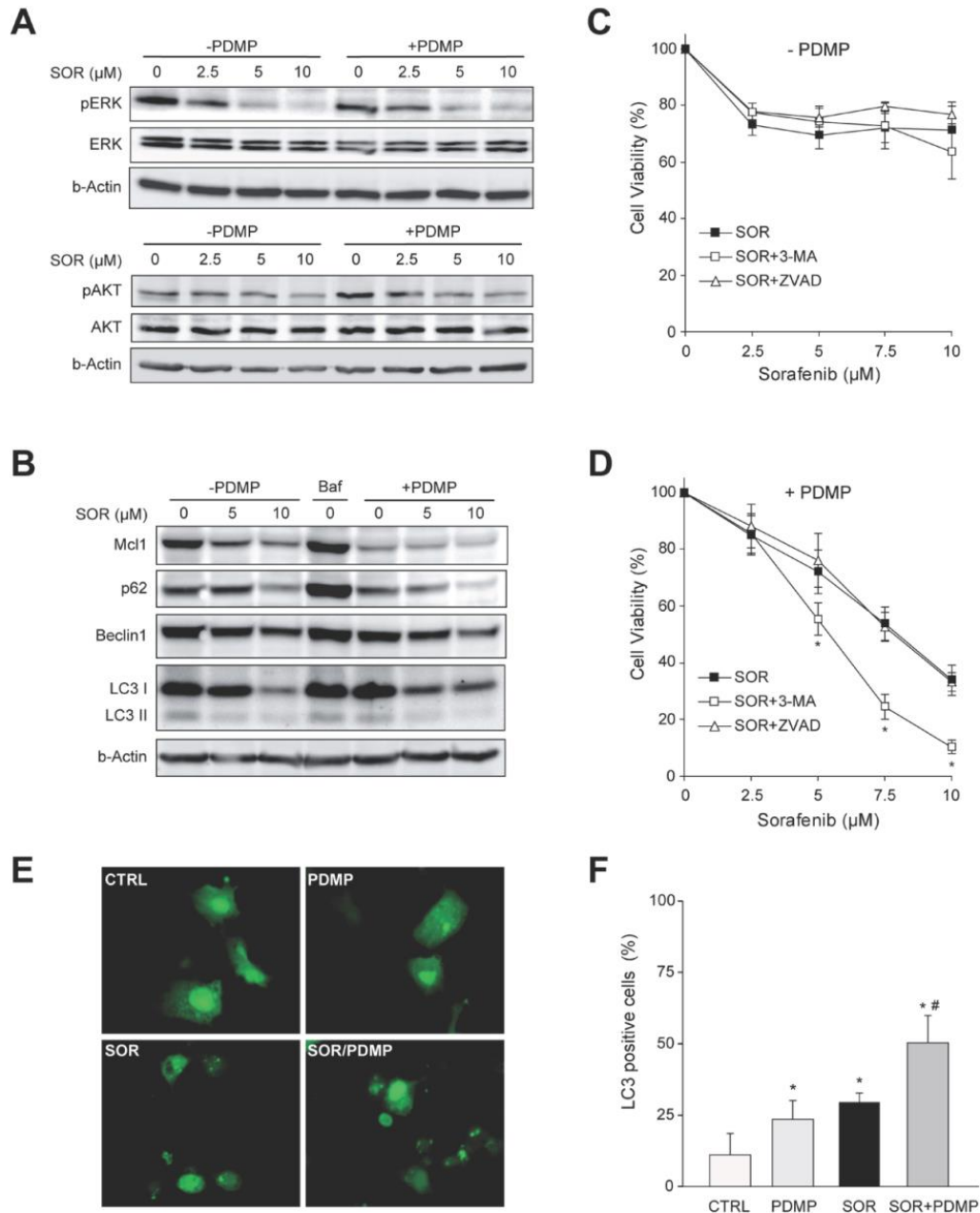


Figure 5: Signaling changes after GCS inhibition in sorafenib treated hepatoma cells. **A.** Protein levels of ERK and AKT phosphorylation in Hep3B cells after 16 h exposure to increasing doses of sorafenib (2.5, 5, 10 μM) with or without PDMP (30 μM, 4 h) for 4 h. **B.** Expression levels of Mcl1, Beclin 1, p62 and LC3 were analyzed by Western blot and β-actin used as a loading control. Bafilomycin A1 (Baf, 0.1 μM) was used as autophagy inhibitor. **C.** and **D.** Cell viability of Hep3B cells pretreated (30 min) with autophagy inhibitor (3MA, 2 μM) or pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK (ZVAD, 25 μM) before sorafenib/PDMP exposure for 16 hours. *, p<0.05 vs. control Hep3B cells. **E.** Hep3B cells expressing GFP-LC3 were treated with sorafenib and/or PDMP and representative images were taken 6 hours later. **F.** Wide-field pictures were taken and the number of GFP-LC3-positive autophagosomes per cell was counted in 100 cells per condition. Hep3B cells exhibiting three or more green puncta per cell were considered positive. *, p<0.05 vs. control Hep3B cells. #, p<0.05 vs. sorafenib Hep3B cells.

Interestingly, despite the lack of changes in ROS and MMP by GCS inhibition in sorafenib-treated HCC cells, combined drug treatment enhanced the release of cytochrome c into the cytosol (Figure 6C), indicative of mitochondrial outer membrane permeabilization. Of note, neither sorafenib (1-10 μ M) nor PDMP alone up to 6-8 hours exposure induced cytochrome c release, although sorafenib alone at doses higher than 10 μ M triggered cytochrome c translocation in O/N experiments (not shown here).

Since mitochondrial cytochrome c release frequently triggers caspase-dependent cell death through activation of executor caspases, we measured caspase-3 levels compared to TNF plus cycloheximide. Sorafenib increased caspase-3 activity modestly in hepatoma cells, that was not further enhanced by PDMP addition (Figure 6D), despite the induction of cytochrome c release and cell death. Notably, sorafenib/PDMP-induced cell death was not blocked by pre-incubation with a pan caspase inhibitor ZVAD (Figure 5D), at doses previously verified to block Fas-induced apoptosis [17], further suggesting that the mechanism involved in PDMP sensitization is caspase-independent.

Elevation of glycolysis and enhanced autophagy may cooperate to protect cells from caspase independent cell death [28], preserving viability even after decline of MMP. Release of mitochondrial intermembrane proteins such as

cytochrome c induces a rapid loss of activity in respiratory complexes jeopardizing mitochondrial functionality, and leading to bioenergetic crisis and cell death [34]. To test if GCS inhibition triggers this mechanism, we determined changes in ATP concentration on sorafenib/PDMP exposed cells. While neither sorafenib nor GCS inhibition reduced ATP levels in Hep3B cells, the combination sorafenib/PDMP depleted ATP levels (Figure 6E), suggesting the induction of mitochondrial collapse by GCS inhibition in sorafenib-treated cells. To discard that this effect was caused by a decline in the number of mitochondria as a consequence of the treatments, we examined for changes in the mitochondrial DNA copy number in cells [35]. Despite the mitochondrial dysfunction observed after 6 hours following sorafenib/PDMP administration, no alteration in mitochondrial DNA amount was detected indicating that a decrease in mitochondrial mass was not the reason for the mitochondrial alteration (Suppl. Fig. 7).

Moreover, although most tumors exhibit a preferential switch to glycolysis, ceramide may reduce GAPDH expression targeting the “Warburg effect”, as observed in melanoma cells [36]. However, sorafenib did not change GAPDH expression regardless of the presence of PDMP (Suppl. Fig. 8), suggesting a mitochondrial contribution in the ATP decline caused by the PDMP/sorafenib cotreatment. Moreover, GCS inhibition in sorafenib-treated cells caused significant nuclear

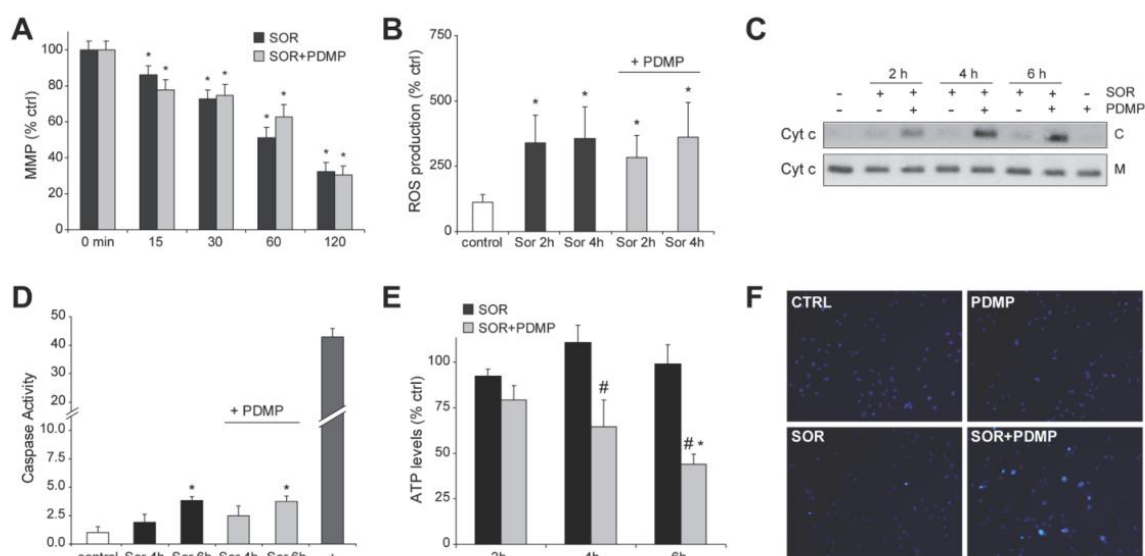


Figure 6: GCS inhibition induces cytochrome c release and ATP depletion to sorafenib-treated hepatoma cells. A. Mitochondrial membrane potential by JC1 determination and **B.** ROS production by DCF quantification was determined in Hep3B cells exposed to sorafenib (10 μ M) and PDMP (50 μ M). **C.** cytochrome c levels in cytosol (C) and mitochondria (M) were analyzed by western blot in cell extracts from sorafenib/PDMP treated cells. **D.** Fold increase in caspase 3 activity was determined in total cell extracts as above, and TNF (50 ng/ml) plus cycloheximide (40 μ M) used as a positive control (+). **E.** and **F.** ATP levels were measured in Hep3B cells treated with sorafenib and compared to sorafenib+PDMP combination. *, $p < 0.05$ vs. control Hep3B cells. #, $p < 0.05$ vs. sorafenib-treated Hep3B cells. **F.** Nuclear Hoechst staining was visualized in Hep3B cells treated with sorafenib and/or PDMP.

condensation (12.7 ± 2.5 , 8 hours), detected by Hoechst staining (Figure 6F), compared to sorafenib ($2.3 \pm 0.7\%$) or PDMP ($1.6 \pm 0.7\%$) alone, without evidences of fragmented nuclei on later times of incubation (data not shown). Apparently, since executioner caspases require for full apoptotic death a non-oxidative environment and an operational ATP production, in sorafenib/PDMP treated cells, despite cytochrome c release, caspase activation is blocked forcing the cell to die by a caspase-independent mechanism after mitochondrial collapse. However, to better characterize this event a complete bioenergetic study with a flux analyzer would be required.

Hepatoma cell lines exhibit acquired sorafenib-resistance and high GCS expression after long-time exposure to sorafenib

The systemic treatment with sorafenib in patients with advanced HCC results in limited survival benefits suggesting the existence of primary and acquired drug resistance mechanisms [4–6]. To evaluate if GCS overexpression may participate in sorafenib-resistant

phenotype, Hep3B and HepG2 cells were grown during 12 months in the presence of sorafenib (0-5 μM) leading to sorafenib resistance (Figure 7A-7B). Of note, before MTT assays, hepatoma cells chronically exposed to sorafenib were maintained in culture medium without sorafenib for a week before assays. Moreover, hepatoma resistant cells displayed almost no reduction in ERK signaling after sorafenib exposure, in opposition to sensitive cells, while exhibiting resistance for more than one month after sorafenib withdrawal and cross-resistance to other chemotherapeutic agents, such as doxorubicin (data not shown). Afterwards, we checked for alterations in the sphingolipid metabolism after long-term sorafenib administration in hepatoma cells. While short-time sorafenib addition stimulated mRNA changes in several sphingolipidic enzymes (Table 1), Hep3B cells with acquired sorafenib resistance exhibited modifications only in very specific sphingolipidic proteins (Table 2), most prominently in GCS expression. An effect also observed in HepG2 resistant cells (Suppl. Table 2). To validate if GCS expression could play a role in sorafenib resistance, we reduced GCS levels by RNA interference.

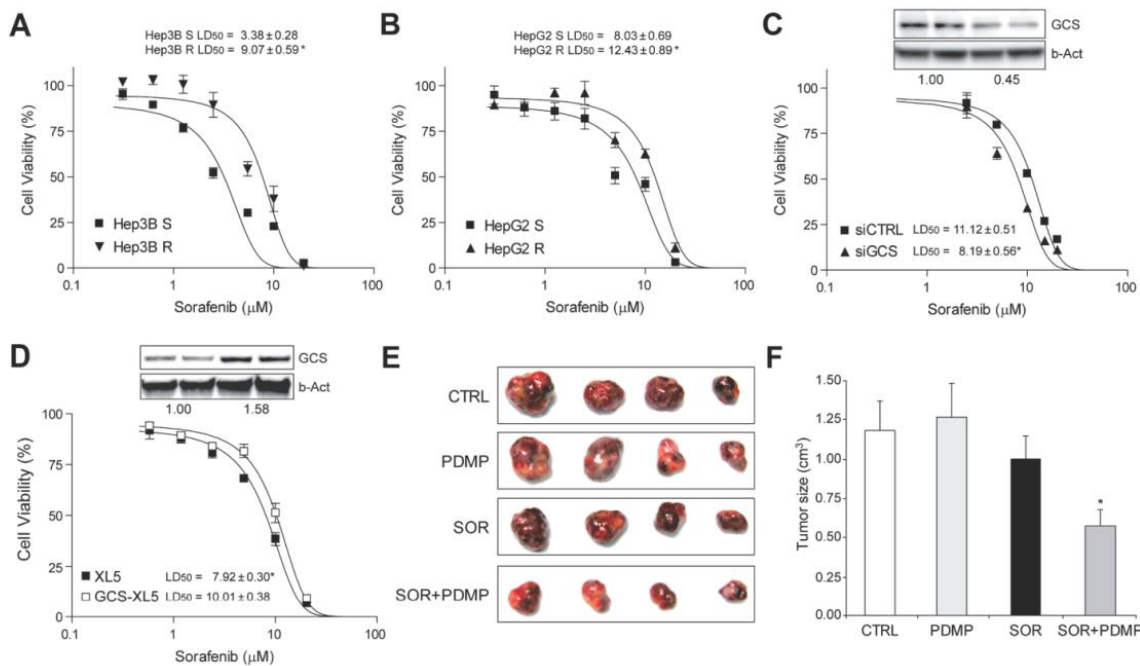


Figure 7: Sorafenib-resistant hepatoma cells were re-sensitized to sorafenib exposure by GCS targeting *in vitro* and in tumor mouse model. **A.** and **B.** dose-response analysis by MTT in Hep3B and HepG2 cells after long-term drug exposure. **C.** Cell viability of Hep3B R cells after transfection with siRNA against GCS (siGCS) or control (siCTRL) and sorafenib exposure. Representative image of protein levels in upper panel. *, $p < 0.05$ vs. siCTRL Hep3B cells. **D.** Hep3B cells transfected with vector control (PCMV6-XL5) or GCS-PCMV6-XL5, with protein levels shown in upper panel, were exposed to sorafenib and cell viability determined. *, $p < 0.05$ vs. sorafenib-sensitive (S) hepatoma cells. **E.** and **F.** Representative image of sorafenib-resistant HepG2 subcutaneous tumors after 4 weeks of treatment with vehicle (CTRL), sorafenib and/or GCS inhibitor (PDMP), and graphical representation of tumor volumes (CTRL, $n=6$; PDMP, $n=5$; SOR, $n=12$; SOR+PDMP, $n=11$). *, $p < 0.05$ vs. sorafenib-treated (SOR) tumors.

Table 2: mRNA levels of main sphingolipidic enzymes in sorafenib-resistant and sensitive Hep3B cells

	Hep3B S	Hep3B R
ASMase	1.00±0.25	0.97±0.10
NSMase	1.00±0.22	1.12±0.22
ACDase	1.00±0.11	1.04±0.37
NCDase	1.00±0.18	0.98±0.23
CerS2	1.00±0.15	1.20±0.19
CerS4	1.00±0.27	1.05±0.29
GCS	1.00±0.09	4.28±0.38 *
SPT	1.00±0.16	1.17±0.13
SK1	1.00±0.25	1.90±0.29 *

Ceramide-related enzymes were analyzed by RT-PCR in Hep3B cells that exhibit sorafenib resistance after long-term exposure to sorafenib (Hep3B R) or vehicle (Hep3B S). (n=3). *, p<0.05 vs. control.

Sorafenib-resistant Hep3B cells (Hep3B R cells) transfected with siRNA against GCS displayed increased sensitivity upon sorafenib administration (Figure 7C). Moreover, pharmacological inhibition of GCS with PDMP was effective in reducing sorafenib resistance in Hep3B R cells dose-dependently (Suppl. Fig. 9). Similar results were also observed in HepG2 resistant cells (Suppl. Fig. 10). To further verify this observation, we overexpressed GCS in Hep3B cells before exposure to sorafenib (Figure 7D). GCS-transfected Hep3B cells displayed reduced sorafenib-induced cell death, suggesting that GCS mediates, at least partially, sorafenib-acquired resistance in hepatoma cells.

Therefore, since our results indicated that GCS overexpression could contribute to the inefficacy of sorafenib-therapy, we addressed if enhanced expression of GCS also occurs in tumors from HCC patients. To do so, we measured GCS mRNA levels in a human cDNA array from normal liver tissue or individuals with different HCC staging. Our results did not detect changes in GCS levels depending on the HCC stage (Suppl. Fig. 11), probably indicating a relevant role of GCS in cancer-resistance rather than in tumor progression or invasiveness.

Sorafenib-resistant HepG2 xenografts tumors displayed sorafenib sensitivity after GCS inhibition

Enhanced metastatic potential of hepatoma cells with sorafenib resistance has been previously reported in an orthotopic HCC model [37]. In our experiments, we did not detect differences in terms of multiplicity or engraftment between sorafenib-resistant HepG2 tumors compared to mice inoculated with parental HepG2 cells. Once developed, animals were randomly divided in groups and treated with sorafenib or vehicle in combination with GCS inhibitor PDMP. Our results verified tumor sorafenib resistance during the study, while the combined therapy (PDMP plus sorafenib) significantly reduced the growth of

resistant tumors (Figure 7E-7F). Of note, GCS inhibition alone did not affect tumor volume (Figure 7F), and did not cause any detectable liver damage alone or combined with sorafenib (data not shown). In conclusion, GCS antagonism restored tumor sensitivity to sorafenib *in vivo*, suggesting GCS targeting as an interesting strategy against sorafenib-acquired resistance.

DISCUSSION

Sorafenib is the only approved systemic drug recommended for HCC patients with recurrence after resection/ablation or diagnosed at advanced stages [38, 39]. Although other molecular therapies, tested head-to-head versus sorafenib, are explored in phase III clinical trials, none of them have achieved superior results [4-6]. Therefore, despite its limitations, sorafenib is so far the best option for advanced HCC and the first drug able to disclose a weakness in HCC biology likely due to its targeting of multiple pathways. Further research is needed to identify novel molecular targets, but efforts to explore the efficacy of combination therapies with sorafenib should not be obviated. In this sense, our data reveals that ceramide metabolism is activated during sorafenib administration, making plausible strategies in HCC treatment aimed to increase cytotoxicity via ceramide accumulation, by targeting specific ceramide-degrading enzymes such as GCS. Importantly, GCS is overexpressed in sorafenib resistant hepatoma cells after long term exposure, pointing to GCS induction as a specific mediator of sorafenib resistance that provides a potential target for cancer therapy.

Most common mutations in HCC, such as p53 and beta-catenin, are undruggable, therefore, suggesting the need to exploit the use of proteins with well-known inhibitors such as GCS to improve HCC management. In this sense, PDMP [40], is a well characterized GCS inhibitor and has served as a basis of novel GCS inhibitors,

which are now tested in clinical trials. Particularly, eliglustat tartrate, a PDMP derivative designed for the treatment of lysosomal diseases [41], have recently reached FDA approval for Gaucher's disease patients [42]. Obviously, confirmation in preclinical models would be required, but it is tempting to speculate about positive results with immediate medical application.

Compounds that potentiates sorafenib efficacy are important since validate potential targets, and also provide clues for other products acting in the same metabolic pathway or in the same subcellular location. In this sense, our work points to the mitochondria as the organelle where sorafenib toxicity is triggered by PDMP addition. Several reports indicate that sorafenib interferes with the mitochondrial respiratory machinery, inducing loss of membrane potential and ROS production. However, our data shows that sorafenib-treated cells maintained mitochondrial integrity, without any loss of cytochrome c, and with relatively normal ATP levels for several hours. In fact, autophagy induction and the capacity of tumor cells of generating ATP from extra-mitochondrial source via glycolysis (Warburg effect) are adaptive mechanisms that allow tumor recovering after strong mitochondrial damage, sometimes from only a small fraction of surviving mitochondria [43]. It is conceivable that sorafenib is acting similarly in the absence of other mitochondrial-damaging stimuli, being insufficient to cause death in most hepatoma cells. In fact, recent data indicates that the mitochondrial damage induce by sorafenib is accompanied by progressive glycolytic reprogramming to help cells to survive under energetic stress [44]. Regarding this point, we cannot rule out that GCS inhibition may be also blocking the glycolytic pathway of ATP generation, such as observed in chronic lymphocytic leukemia treated with nanoliposomal ceramide [36]. However, we detected no reduction in GADPH activity after PDMP/sorafenib treatment. In line with these finding, our data support a pathway in which GCS inhibition leading to increase ceramide levels targets mitochondria, inducing cytochrome c release, loss of ATP and energetic collapse, making hepatoma cells incapable of recovery and destined to die.

Numerous publications have shown how ceramide accumulation perturbs the mitochondrial integrity [13, 16, 14, 31–33], similarly to our observations in sorafenib-treated hepatoma cells. In particular, changes in sphingolipid composition of the mitochondrial membranes seem to alter the specific lipid milieu required for Bak/Bax activation modifying the cell death induced by BH3-only proteins [32, 33]. Therefore, it is plausible that molecules, such as specific Bcl-2 inhibitors, could elude the incomplete MMP induced by sorafenib by breaking the resistance at the point of Bax or Bak activation, as observed in the PDMP/sorafenib combination. In line with this, Bcl-xL inactivation (ABT-737) in combination with sorafenib, that down-regulates Mcl-1 expression

specifically in tumor cells, efficiently induced cell death in hepatoma cells [45]. In fact, a recent report has shown in vinorelbine-resistant lung adenocarcinoma cells an increase in GCS activity which was associated with induction of Bcl-xL-mediated cell survival [46]. Interestingly, this is not the only link established between ceramide metabolism and Bcl-2 protection. A recent publication proposes a feed-forward model by which BAK activation by chemotherapeutic drugs, and particularly by BH3 mimetics, leads to elevated ceramide levels resulting in synergistic channel formation by ceramide metabolites and BAX/BAK. Certainly, if this mechanism is induced by the combination of sorafenib and Bcl-2 mimetics is a point that deserves further investigation [47]. In fact, it is possible that other mitochondrial interfering molecules may potentiate sorafenib efficacy maybe due to the dependence on mitochondrial biogenesis of cancer stem cells survival [48]. Accordingly, our results point to GCS targeting as an interesting approach to increase sorafenib efficacy in HCC management, and support strategies aiming mitochondria to improve sorafenib therapy.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and conditioned medium preparation

Human liver tumor cell lines Hep3B, PLC and HepG2 (European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC)) were grown in DMEM (10% FBS) at 37°C and 5% CO₂. To generate sorafenib-resistant hepatoma cells, freshly thawed Hep3B and HepG2 cells were cultured with 1 μM of sorafenib and, after a month, the concentration slowly increased by 0.5 μM per month (up to 5 μM). After 8 to 10 months, two sorafenib-resistant cell lines, termed HepG2 R and Hep3B R, were obtained. The LD50 of the cells to sorafenib was determined in 96-well plates, routinely for 24 hours and cell viability measured by MTT assay.

qPCR and Immunoblot analysis

Total DNA isolated with and total RNA with TRIzol reagent were analyzed with SensiFAST SYBR One-Step Kit (Bioline. Ecogen, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions, as detailed in Supplemental Methods. Western blots were performed as indicated in Supplemental Methods.

RNA interference and GCS overexpression

HepG2 and Hep3B cells were transfected with siRNAs, designed to knockdown gene expression of GCS, ACDase or control (siGCS, sc-45404; siACD, sc-105032; siCTRL, sc-37007, Santa Cruz Biotechnologies), or with GCS-expressing or PCMV6-XL5 control vectors

(Origene, Rockville, MD, USA). RNA silencing or GCS overexpression were verified by western blot and qPCR, as detailed in Supplemental Methods.

Biochemical analysis

Cell viability, clonogenic assays, Hoechst staining, caspase-3 activity, mitochondrial membrane potential (MMP), reactive oxygen species (ROS) production [17], mitochondrial DNA content, mitochondrial Complex I activity, GAPDH expression and ATP levels were analyzed as explained in Supplemental Methods. Ceramide determination after [¹⁴C]palmitic acid labeling, and GCS/ACDase activities were performed as previously described [13, 18], and detailed in Supplemental Methods.

Tumor animal model

All animal procedures were performed according to protocols approved by the Animal Experimentation Ethics Committee from the University of Barcelona. For subcutaneous tumor model, male Swiss nude mice, 5-6 week old, were kept under pathogen-free conditions with free access to standard food and water. HepG2 cells (5×10^6) or Hep3B cells (2.5×10^6) were injected subcutaneously into the flanks of mice in 200 μ L DMEM without FBS, as previously reported [13, 19]. Treatment with GCS inhibitor 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propranol (PDMP) or vehicle (saline solution) was delivered i.p. daily, while sorafenib was administered via oral gavage at a dose of 80 μ g/g body weight for 21 days. Tumors were measured periodically with a vernier caliper, and the volume was calculated as length \times width² \times 0.5.

Immunohistochemical staining

Tumors were fixed and 5- μ m sections were prepared following standard procedures. The antibodies used were mAb anti-PCNA antibody (PC10) (1:200, sc-56, Santa Cruz) and anti-CD34 (1:100, sc-18917, Santa Cruz). The slices were examined with a Zeiss Axioplan microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera. PCNA index was quantified in four randomly selected fields from each animal, and CD34 positive areas analyzed using ImageJ software. Apoptotic cells with fragmented nuclei were detected in paraffin samples using TUNEL labeling containing fluorescein-dUTP and -dNTPs (TUNEL Label Mix, Roche). TUNEL positive cells were observed and quantified using a NIKON Eclipse E-100 microscope.

Statistical analyses

Results are expressed as mean \pm standard deviation and n=3, unless indicated. Statistical comparisons were

performed using unpaired 2-tailed Student's t test or 1-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test (GraphPad Prism). A *P* value less than 0.05 was considered significant.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors are indebted to Susana Nuñez for her technical support. Most of the work of this study was carried out at the Esther Koplowitz Centre (CEK).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

FINANCIAL SUPPORT

This study was funded by grants from the Instituto de Salud Carlos III (FIS PI12/00110, PI09/00056 to A.M., PI13/00374 to M.M., PI13/01339 to A.V., and SAF2015-69944-R and PI11/0325 to J.F.C.), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2012/34831 to J.F.C., SAF2014-57674-R to C.G.R. and SAF2013-47246-R to A.C.) and co-funded by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea. "Una manera de hacer Europa"); center grant P50-AA-11999 from Research Center for Liver and Pancreatic Diseases, US NIAAA to J.F.C.); Fundació la Marató de TV3 to J.F.C. and A.C., Mutua Madrileña (AP103502012) to C.G.R., and by CIBEREHD from the Instituto de Salud Carlos III. We also want to thank the support of the AGAUR (2014SGR785) from the Generalitat de Catalunya.

Author contributions

M.S., A.T., G.M., C.B., E.G., E.B., and C.M. performed the experiments; A.C., J.F.C., M.M., C.G.R., A.V. and A.M. designed experiments and revised the results; J.F.C., and A.M. were primarily responsible for writing the manuscript. All authors contributed to manuscript editing and approval.

Abbreviations

ACDase, acid ceramidase; ASMase, acid sphingomyelinase; GCS, glucosylceramide synthase; CerS, ceramide synthase; HCC, hepatocellular carcinoma; MDR, multidrug-resistance; MMP, mitochondrial membrane potential; PDMP, 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propranol; NOE, N-oleoylethanolamine; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; ROS, reactive oxygen species; SK1, sphingosine kinase 1; SPT, serine palmitoyl transferase; WT, wild type.

REFERENCES

- Villanueva A, Llovet JM. Liver cancer in 2013: Mutational landscape of HCC--the end of the beginning. *Nat Rev Clin Oncol*. 2014; 11:73-74.
- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10:656-665.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359:378-390.
- Wörms MA, Galle PR. HCC therapies--lessons learned. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11:447-452.
- Berasain C. Hepatocellular carcinoma and sorafenib: too many resistance mechanisms? *Gut*. 2013; 62:1674-1675.
- Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res*. 2014; 20:2072-2079.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signaling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9:139-150.
- Morad SA, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13:51-65.
- Truman JP, García-Barros M, Obeid LM, Hannun YA. Evolving concepts in cancer therapy through targeting sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1841:1174-1188.
- Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, Salas A, Ogretmen B. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol*. 2010; 6:1603-1624.
- Senchenkov A, Litvak DA, Cabot MC. Targeting ceramide metabolism--a strategy for overcoming drug resistance. *J Natl Cancer Inst*. 2001; 93:347-357.
- Tagaram HR, Divittore NA, Barth BM, Kaiser JM, Avella D, Kimchi ET, Jiang Y, Isom HC, Kester M, Staveley-O'Carroll KF. Nanoliposomal ceramide prevents in vivo growth of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2011; 60:695-701.
- Morales A, Paris R, Villanueva A, Llacuna L, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene*. 2007; 26:905-916.
- Savić R, He X, Fiel I, Schuchman EH. Recombinant human acid sphingomyelinase as an adjuvant to sorafenib treatment of experimental liver cancer. *PLoS One*. 2013; 8:e65620.
- Tran MA, Smith CD, Kester M, Robertson GP. Combining nanoliposomal ceramide with sorafenib synergistically inhibits melanoma and breast cancer cell survival to decrease tumor development. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:3571-3581.
- Morales A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Colell A, Fernandez-Checa JC. Hepatocarcinogenesis and ceramide/cholesterol metabolism. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012; 12:364-375.
- Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, Enrich C, Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell Metab*. 2006; 4:185-198.
- Llacuna L, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Critical role of acidic sphingomyelinase in murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 2006; 44:561-572.
- Montero J, Morales A, Llacuna L, Lluís JM, Terrones O, Basañez G, Antonsson B, Prieto J, Garcia-Ruiz C, Colell A, Fernández-Checa JC. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2008; 68:5246-5256.
- Kolesnick R. The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*. 2002; 110:3-8.
- Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*. 2010; 62:347-356.
- Morales A, Fernandez-Checa JC. Pharmacological modulation of sphingolipids and role in disease and cancer cell biology. *Mini Rev Med Chem*. 2007; 7:371-382.
- Panka DJ, Wang W, Atkins MB, Mier JW. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase-independent apoptosis in melanoma cells. *Cancer Res*. 2006; 66:1611-1619.
- Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ, Szulc ZM, Bielawski J, Ogretmen B. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol*. 2012; 8:831-838.
- Zhai B, Hu F, Jiang X, Xu J, Zhao D, Liu B, Pan S, Dong X, Tan G, Wei Z, Qiao H, Jiang H, Sun X. Inhibition of Akt reverses the acquired resistance to sorafenib by switching protective autophagy to autophagic cell death in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Ther*. 2014; 13:1589-1598.
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122:927-939.
- Tai WT1, Shiao CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, Chen PJ, Chen KF. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis*. 2013; 4:e485.
- Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, et al. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome

- c release in the absence of caspase activation. *Cell*. 2007; 129:983-997.
29. Shen W, Henry AG, Paumier KL, Li L, Mou K, Dunlop J, Berger Z, Hirst WD. Inhibition of glucosylceramide synthase stimulates autophagy flux in neurons. *J Neurochem*. 2014; 129:884-894.
 30. Bull VH, Rajalingam K, Thiede B. Sorafenib-induced mitochondrial complex I inactivation and cell death in human neuroblastoma cells. *J Proteome Res*. 2012; 11:1609-1620.
 31. García-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997; 272:11369-11377.
 32. Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ, Obeid LM, Green DR. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*. 2012; 148:988-1000.
 33. Lee H, Rotolo JA, Mesicek J, Penate-Medina T, Rimner A, Liao WC, Yin X, Ragupathi G, Ehleiter D, Gulbins E, Zhai D, Reed JC, Haimovitz-Friedman A, et al. Mitochondrial ceramide-rich macrodomains functionalize Bax upon irradiation. *PLoS One*. 2011; 6:e19783.
 34. Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*. 2014; 127:2135-2144.
 35. Phillips NR1, Sprouse ML1, Roby RK2. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: a multiplex real-time PCR assay. *Sci Rep*. 2014; 4:3887.
 36. Ryland LK, Doshi UA, Shanmugavelandy SS, Fox TE, Aliaga C, Broeg K, Baab KT, Young M, Khan O, Haakenson JK, Jarbadan NR, Liao J, Wang HG, et al. C6-ceramide nanoliposomes target the Warburg effect in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2013; 8:e84648.
 37. Chow AK, Ng L, Lam CS, Wong SK, Wan TM, Cheng NS, Yau TC, Poon RT, Pang RW. The enhanced metastatic potential of hepatocellular carcinoma (HCC) cells with sorafenib resistance. *PLoS One*. 2013; 8:e78675.
 38. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004; 64:7099-7109.
 39. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359:378-390.
 40. Huang WC, Tsai CC, Chen CL, Chen TY, Chen YP, Lin YS, Lu PJ, Lin CM, Wang SH, Tsao CW, Wang CY, Cheng YL, Hsieh CY, et al. Glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes chronic myeloid leukemia T315I mutant to Bcr-Abl inhibitor and cooperatively induces glycogen synthase kinase-3-regulated apoptosis. *FASEB J*. 2011; 25:3661-673.
 41. Shayman JA. Eliglustat tartrate: Glucosylceramide Synthase Inhibitor Treatment of Type 1 Gaucher Disease. *Drugs Future*. 2010; 35:613-620.
 42. Poole RM. Eliglustat: first global approval. *Drugs*. 2014; 74:1829-1836.
 43. Tait SW, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, Green DR. Resistance to caspase-independent cell death requires persistence of intact mitochondria. *Dev Cell*. 2010; 18:802-813.
 44. Tesori V, Piscaglia AC, Samengo D, Barba M, Bernardini C, Scatena R, Pontoglio A, Castellini L, Spelbrink JN, Maulucci G, Puglisi MA, Pani G, Gasbarrini A. The multikinase inhibitor Sorafenib enhances glycolysis and synergizes with glycolysis blockade for cancer cell killing. *Sci Rep*. 2015; 5:9149.
 45. Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology*. 2010; 52:1310-1321.
 46. Chiu WH, Su WC, Li CL, Chen CL, Lin CF. An increase in glucosylceramide synthase induces Bcl-xL-mediated cell survival in vinorelbine-resistant lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget*. 2015; 6:20513-24. doi: 10.18632/oncotarget.4109.
 47. Beverly LJ1, Howell LA, Hernandez-Corbacho M, Casson L, Chipuk JE, Siskind LJ. BAK activation is necessary and sufficient to drive ceramide synthase-dependent ceramide accumulation following inhibition of BCL2-like proteins. *Biochem J*. 2013; 452:111-119.
 48. Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*. 2015; 6:4569-84. doi: 10.18632/oncotarget.3174.

SUPPLEMENTARY DATA

TABLE OF CONTENTS

Supplemental Methods	page 1
Reagents	page 1
SDS-PAGE and immunoblot analysis	page 1
RNA isolation and real time RT-PCR	page 1
MTT assay	page 2
Crystal Violet, Caspase-3 and JC1 assays	page 2
Hoechst staining, Reactive Oxygen Species and ATP assays	page 2
GAPDH, Mitochondrial DNA content and Complex I activity	page 3
Ceramide quantification and GCS assay	page 3
ACDase assay and cDNA Array	page 4
Supplemental Figures	page 5

SUPPLEMENTAL METHODS

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin and dimethyl sulfoxide (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (M2128), Hoechst 33258 (B1155), Crystal Violet (C0755), N-Oleoyl ethanolamine (NOE) (O0383), Imipramine (I0899) and DCF (D6883) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All tissue culture-ware was from Nunc (Roskilde, Denmark). Biotin Blocking System, peroxidase substrate (DAB) and peroxidase buffer were from DAKO (Glostrup, Denmark). Aquatex was from Merck (Darmstadt, Germany). The ABC kit was from Vecstain (Burlingame, CA). Proteinase inhibitors were from Roche (Madrid, Spain). ECL western blotting substrate was from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). UGCG siRNA (h) (sc-45404), Acid Ceramidase siRNA (h) sc-105032 and scrambled controls were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dalla, TX); as well as DL-threo-1-Phenyl-2-decanoyl amino-3-morpholino-1-propanol (DI-threo-PDMP, Hydrochloride) (sc-203030), C-6 NBD Ceramide (N-Hexanoylsphingosine) (sc-204661), C-12 NBD Ceramide (N-Palmitoylsphingosine) (sc-205232), HA14-1 (sc-205911), Z-VAD-FMK (sc-3067), 3 Methyladenine (3-MA) (sc-205596) and Bafilomycin A1 (sc-201550). One Shot® TOP10 chemically competent cells, Lipofectamine2000 (11668-027), Lipofectamine3000 (L3000008), Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (LC5800) and JC-1 (T-3168) were from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA) Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) is manufactured by Bayer. C6- Ceramide (N-Hexanoylsphingosine) (BML-SL-110-0005); C16- Ceramide (N-Palmitoylsphingosine) (BML-SL-115-0005);

Myriocin (BML-SL226-0005) were from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY).

SDS-PAGE and immunoblot analysis

Cell lysates were prepared in RIPA buffer plus proteinase inhibitors. Samples containing 10 to 30 µg were separated by 8-10% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, blocked in 8% nonfat milk for 1h at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies:

BECLIN-1 (SantaCruz, sc-11427) 1:250 rabbit
 Mcl-1 (S-19) (SantaCruz, sc-819) 1:250 rabbit
 Bcl-2 (N-19) (SantaCruz, sc 492) 1:250 rabbit
 P62/SQSTM1 (D-3) (SantaCruz, sc-28359) 1:250 mouse
 pAKT 1/2/3 (ser 473)-R (SantaCruz, sc-7985-R) 1:250 rabbit
 AKT 1/2 (N-19) (SantaCruz, sc-1619) 1:250 rabbit
 MAP LC3β (H-50) (SantaCruz, sc-28266) 1:250 rabbit
 MAP Kinase diphosphorylated (pERK1/2) (Sigma, M 8159) 1:1000 mouse
 MAP Kinase (ERK1/2) (Sigma, M 5670) 1:10000 rabbit
 GCS/UGCG (Proteintech, 12869-1-AP) 1:1000 rabbit
 ACDase (BD Biosciences, 612302) 1:1000 mouse
 Cytochrome C (SantaCruz, sc-1356) 1:250 mouse

RNA isolation and real time RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent. Real-time RT-PCR was performed with SensiFAST SYBR One-Step Kit (Bioline. Ecogen, Barcelona, Spain) following the manufacturer's instructions. The primers sequences used were:

Acid Ceramidase: human ACDase, Fw 5' CTACCCAAGTCTCAGCGCGCTT 3', Rv 5' GCACCTCTGTACGTTGGTCTCTGAA 3' (GenBank # NM_004315);

Glucosylceramide synthase: human GCS, Fw 5' GCCTTGGAGGGAATGGCCGTC 3' Rv 5' GAGAGACACCTGGGAGCTTGCTA 3' (GenBank # NM_003358);

Acid Sphingomyelinase: human ASMase Fw 5' GTCTCCGCCTCATCTCTCTC 3' Rv 5' GCACCTTGTCTCCTCGATCC 3' (GenBank # NM_000543)

Ceramide Synthase 2 : human CerS2 Fw 5' ACCCGAGCAGACGGAGTACACGG 3', Rv 5' ACCCGAGCAGACGGAGTACACGG 3' (GenBank # NM_181746)

Serine Palmitoyl Synthase: human SPT Fw
5' CGTGGGGACTTGTGGACCCA 3', Rv 5'
AGCACTGGCTATGGTGGCAAATCC 3' (GenBank #
NM_006415)

Sphingosine Kinase: human SphK Fw
5' GGGCGCTCCAGTCCCTCAGA 3', Rv 5'
GTCGGTCCGGTTTGCTGGGG 3' (GenBank #
NM_021972)

β -Actin: human β -Actin Fw 5'
GGACTTCGAGCAAGAGATGG 3', Rv 5'
AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG 3' (GenBank #
NM_001101)

18S Ribosomal RNA: human 18S Fw
5' CCGAAGATATGCTCATGTGG 3', Rv 5'
TCTTGTACTGGCGTGGATTC 3' (GenBank #
NM_022551.2)

MTT assay

Cytotoxicity of sorafenib and other reagents were determined by the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay. About 3×10^4 cells per well were plated into a 96-well plate and incubated in 5% CO₂ at 37°C. Stock solution (5 mg/ml) of sterile filtered MTT in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 was added 1/10 to each well. After 2 h of incubation at 37°C, unreacted dye was removed by aspiration, the insoluble formazan crystals were dissolved in 100 μ l/well of solubilization/stop solution (1-propanol) and measured spectrophotometrically in an ELISA reader (Titertek Plus MS 212, ICN, Eschwege, Germany) at a wavelength of 570 nm, and 630 nm (reference). The spectrophotometer was calibrated to zero absorbance using 1-propanol. The net A570 - A630 was taken as the index of cell viability. The net absorbance change taken from the wells of untreated cultured cells was used as the 100% viability value. The relative cell viability (%) related to control wells was calculated by the formula $100 \times [(A570-A630) \text{ sample} / (A570-A630) \text{ control}]$.

Crystal violet assay

About 5×10^4 cells per well were plated into a 12-well plate and incubated in 5% CO₂ at 37°C. After four days of treatments, cells were fixed for 5 min. with 10% formalin, stained for 30 minutes and washed twice with tap water. After draining, plates were inverted for 5 minutes and photographed.

Caspase-3 activity determination

Cells were treated with different extracellular factors, media was removed and cells were scrapped in

a buffer containing 120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.5 % Igepal, 2 mM ethylene glycol-bis-(2-aminoethyl ether) tetraacetic acid, and 50 μ M PMSF, incubated at 4°C for 15 minutes with shaking, and spun down at 12,000 g at 4°C for 15 minutes. Caspase activity was assayed with 200 μ g of cell lysate and 1.25 ml of assay buffer containing 100 mM NaCl, 10% sucrose, 0.1% (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), and 10 mM DTT, pH 7.4, by the release of 7-aminomethyl coumarin (AMC) from 40 nmol of Ac-DEVD-AMC (Calbiochem). Fluorescence was continuously recorded with emission at 460 nm and excitation at 380 nm. A unit of caspase-3 activity is the amount of active enzyme necessary to produce an increase in 1 fluorescence unit in spectrofluorimeter. Results are usually represented as Arbitrary Unit/h/ μ g protein. Data are expressed as fold induction versus control.

Analysis of mitochondrial transmembrane potential by JC-1 staining assay

Cells were loaded with C5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1), a cationic dye that exhibits potential-dependent accumulation in mitochondria, indicated by a fluorescence emission shift from green (~525 nm) to red (~590 nm). Consequently, mitochondrial depolarization is indicated by a decrease in the red/green fluorescence intensity ratio. To evaluate the mitochondrial depolarization induced by drug treatment, we plated 5×10^5 Hep3B cells in 6 well plates. The following day cells were treated as indicated in each experiment. After the treatment, cells were stained for 20 minutes in medium containing JC-1 at the final concentration of 5 μ g/ml. After removal of JC-1, cells were washed once by PBS. Fluorescence is measured in a Microplate Fluorescence Reader using an exciting wavelength of 550 (535) nm for red and 485 nm for green, and an emission wavelength of 600 (590) nm and 535 (530) nm, respectively. Results are calculated as a ratio of red fluorescence divided by green fluorescence. The ratio of red to green fluorescence is decreased in dead cells and in cells undergoing apoptosis compared to healthy cells.

Hoechst staining

About 5×10^4 cells per well were plated into a 12-well plate and incubated in 5% CO₂ at 37°C. After six hours of treatments, 1/1000 of a Hoechst 33258 (10 mg/ml stock solution) was added and incubated for 30 min. Cells were washed twice with regular medium. Images were taken under UV light and 12 random fields for each condition were counted to establish the percentage of cells with condensed nucleus.

Reactive Oxygen Species (ROS) measurement

In order to measure the intracellular content of ROS, we used fluorimetric method. Cells were plated in 12-well plates, and after the treatment they were washed with PBS and incubated with 10 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) in HBSS during 30 minutes at 37°C. The color was incorporated into the cells and converted into 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) when oxidized by hydrogen peroxide. Fluorescence is measured in a Microplate Fluorescence Reader using an exciting wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm. Results are calculated as fluorescence units per μ g protein and expressed as percentage of control.

ATP determination

To determine the intracellular ATP content, we used a bioluminescent assay from Sigma-Aldrich. In short, hepatoma cells were plated in 96-well plates. After the treatments, culture medium was removed, 90 μ L of ATP reagent added to each well and the plate tapped briefly to mix. After 1 minute incubation at room temperature, light emission was determined using a luminometer and images of the plate taken with ImageQuant LAS 4000 equipment (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Results are calculated as light units per μ g protein and expressed as percentage of control.

GAPDH activity assay

To determine the intracellular GAPDH activity we used a spectrophotometric kit from Biovision (#K680-100). In short, through this assay GAPDH catalyzes conversion of GAP into 1, 3-Bisphosphate Glycerate and an intermediate, which reacts with the developer to form a colored product (maximal Abs. 450 nm). Results, after standard comparison, are expressed as GAPDH μ Units per ml and minute.

Mitochondrial DNA content

Total DNA was extracted using QuickExtract™ DNA Extraction Solution (Epicentre, Madison, WI) following manufacturer's instructions and changes in mitochondrial DNA copies calculated by comparison with nuclear DNA content in the same samples, as suggested by Phillips *et al.* Specific primers for qPCR used were:

Mitochondrial DNA: mtMinArc Fw 5'
CTAAATAGCCCACACGTTCCC 3', Rv 5'
AGAGCTCCCCTGAGTGTTA 3' (GenBank #
NC_012920)

Nuclear DNA: β 2M Fw 5'
GCTGGGTAGCTCTAAACAATGTATTCA 3', Rv

5' CCATGTACTAACAAATGTCTAAAATGGT 3'
(GenBank #NT_010194.17)

Complex I activity

For the analysis of mitochondrial OXPHOS Complex I enzyme activity from hepatoma protein extracts we used the Complex I Enzyme Activity Dipstick Assay Kit (ab109720) following the manufacturer's instructions. In brief, 20 μ g of protein extract from treated cells were loaded onto a dipstick for each sample. Individual dipsticks were incubated with activity buffer solution containing NADH as a substrate and nitroterazolium blue (NBT) as the electron acceptor, and developed for 45 minutes. After that, bands were photographed and quantified.

[¹⁴C] labeled ceramide quantification by TLC

Hepatocellular carcinoma cells Hep3B were cultured in Dulbecco's modified Eagle medium supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum. Cells were cultured and labeled with [¹⁴C] palmitic acid (2 μ Ci/ml) (Amersham, Piscataway, NJ) for 24h. After the treatment with Sorafenib/PDMP/NOE, cells were washed three times with phosphate buffered saline, scraped off the dish and centrifuged at 6000 rpm for 5 min. Total lipids were extracted from the pellets with 1 ml chloroform/methanol (2:1 by volume), 4h. Ceramide was resolved in LK6D gel 60A TLC plates using chloroform/acetic acid (90:10). Ceramides were separated from the other lipids by thin layer chromatography using diethylether/methanol (99:2, v:v) as the developing system. Two separate spots of radiolabeled lipids were detected on the chromatogram by radioactive scanning.

GCS enzyme assay

The hepatocarcinoma cells were seeded in 6 well plates at 5×10^5 /well. After treatment the samples were scraped off the dish with TE plus 0.1% TritonX-100 pH=7.4, vortexed, centrifuged at 12000 rpm for 5 minutes. Supernatant protein (150 mg/ml) was added to a mix of C6-NBD (1 μ L/sample), UDP-Glucose (5 μ L/sample) and assay buffer Phosphate 0.1% Triton pH=7.8, for the final volume of 250 μ L per each sample. Samples were incubated for 1h at 37°C, added 750 μ L of chloroform:methanol (2:1, v:v), vortexed and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The top (aqueous) layer of each tube is then removed by aspiration and discarded. The bottom layer was transferred to new tubes and dried with heat at the speed-vac. Samples were then redissolved in 50 μ L of spotting solvent, methanol:chloroform (1:1, v:v), and run on Silica 60 thin-layer chromatography plates in chloroform:methanol:ammonia (90:20:0.5 mL) along

with appropriate C6-NBD-lipid standards. The fluorescent lipids on the plates were visualized by UV illumination and quantified using an Alphascreen 2200 Analysis System (Alexandria, VA) and results confirmed in a Perkin Elmer LS50B luminescence spectrometer set at 475 nm for excitation and 525 nm for emission.

ACDase enzyme assay

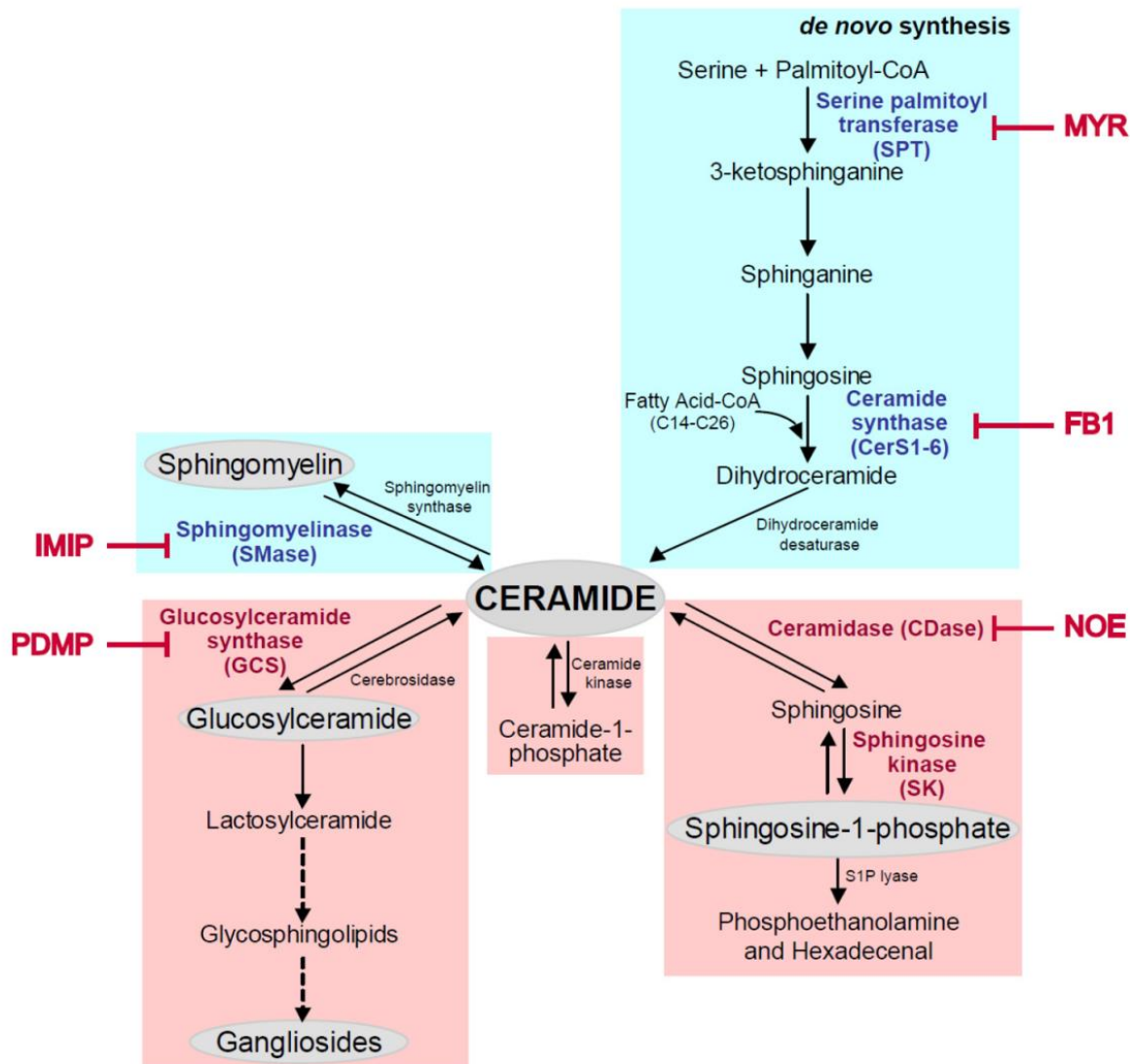
The cells were seeded in 6 well plates at 5×10^5 cell/well concentration. After treatments, the samples were lysed in an acidic buffer (pH 4.5) consisting of 50 mM sodium acetate, 5 mM magnesium chloride, 1mM EDTA, and 0.5% TritonX-100, and samples centrifuged at 12000rpm for 5 minutes. Supernatant protein (150 μ g) was incubated for 1h at 37°C in the assay buffer (pH 4.5) with 0.2% Igepal-CA 630, 250 mM sodium acetate, and 150 μ L of C12-NBD (1 μ L/sample), for the final volume of 250 μ L per each sample. Then, 750 μ L of chloroform:methanol (2:1, v:v) was added to each tube, vortexed, and centrifuged at 5000 rpm for 5 min. The top (aqueous) layer of each tube was removed by aspiration and discarded. The bottom layer was transferred to new tubes and dried

with heat at the speed-vac. Samples were then redissolved in 50 μ L of spotting solvent, chloroform:methanol (1:1, v:v), and run on Silica 60 thin-layer chromatography plates in chloroform:methanol:ammonia (90:20:0.5) along with appropriate C12-NBD-lipid standards. The fluorescent lipids on the plates were visualized by UV illumination and quantified using an Alphascreen 2200 Analysis System (Alexandria, VA) and results confirmed in a Perkin Elmer LS50B luminescence spectrometer set at 475 nm for excitation and 525 nm for emission.

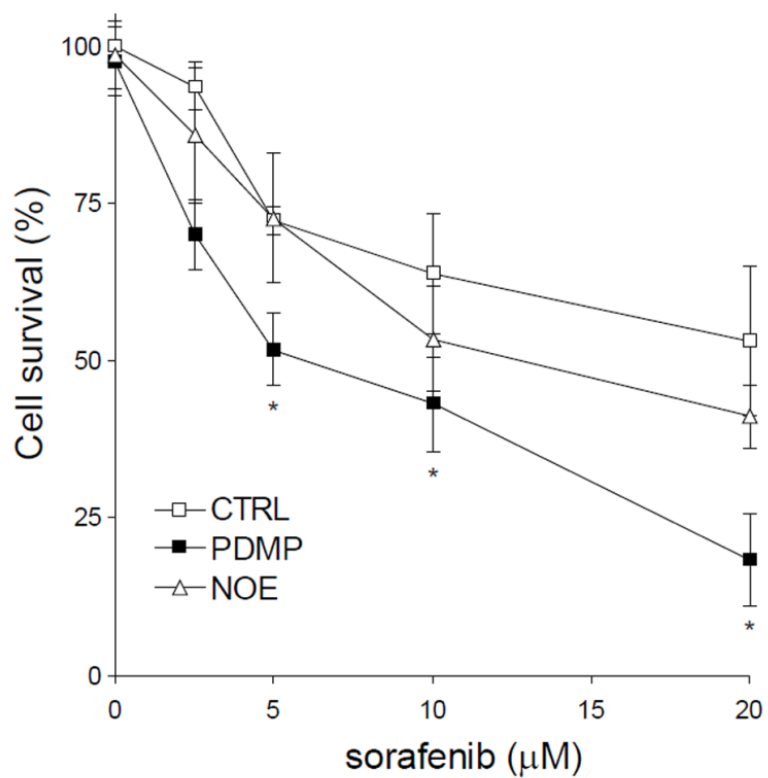
cDNA array

TissueScan™ cDNA Array (Liver Cancer cDNA Array I, Origene) was used to quantify GCS levels in tumor and normal tissues. Tissue cDNAs of each array are synthesized from high quality total RNAs of pathologist-verified tissues, normalized and validated with β -actin in two sequential qPCR analyses, and provided with clinical information and QC data. Our array contained cDNA from 48 samples covering 8-normal, 7-Stage I, 8-II, 8-IIIa, 3-IV and 13- Liver Lesions in identical plates (LVRT101).

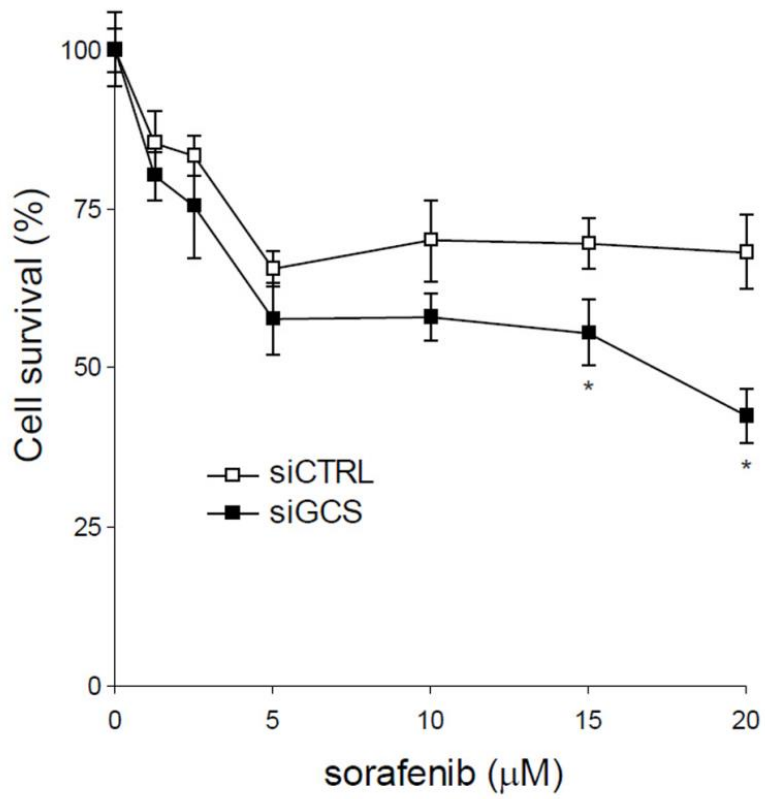
SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES



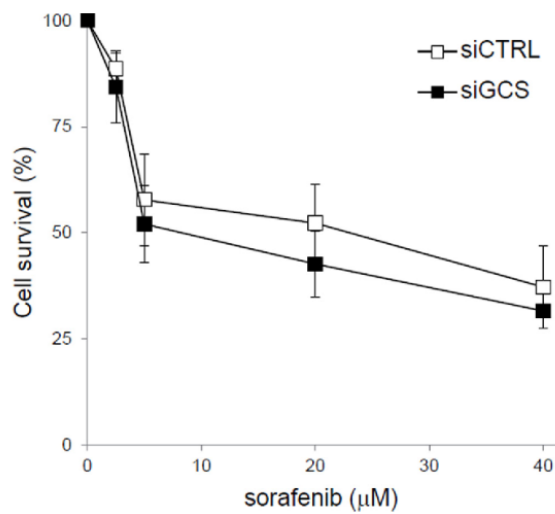
Supplementary Figure S1: Schematic representation of main cellular pathways involved in ceramide metabolism in the liver. Ceramide is mainly generated (in blue): i) *de novo* after condensation of serine with palmitoyl-CoA by the action of the serine palmitoyl transferase (SPT). Afterwards, the long-chain base sphingosine is attached to fatty acyl CoAs of different length through ceramide synthase (CerS1-6) activity; ii) from breakdown of sphingomyelin upon activation of sphingomyelinases (SMases). Ceramide modification to less toxic species occurs (in red) by: a) glycosylation (GCS) to form glycosphingolipids, such as gangliosides; b) transformation to sphingosine-1-phosphate via ceramidase (CDase) and sphingosine kinase (SK) activation; c) phosphorylation by ceramide kinase.



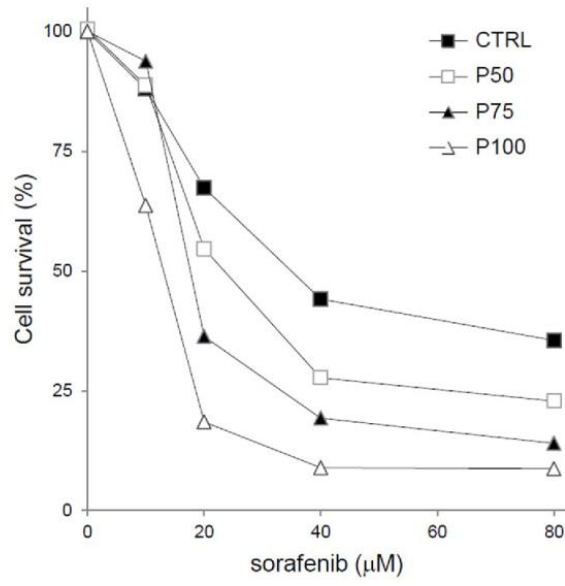
Supplementary Figure S2: Cell viability after sorafenib administration in HepG2 cells treated with vehicle (CTRL), GCS inhibitor (PDMP) or ACDase inhibitor (NOE) during 16 hours. (n=2). *, p<0.05 vs. CTRL HepG2 cells.



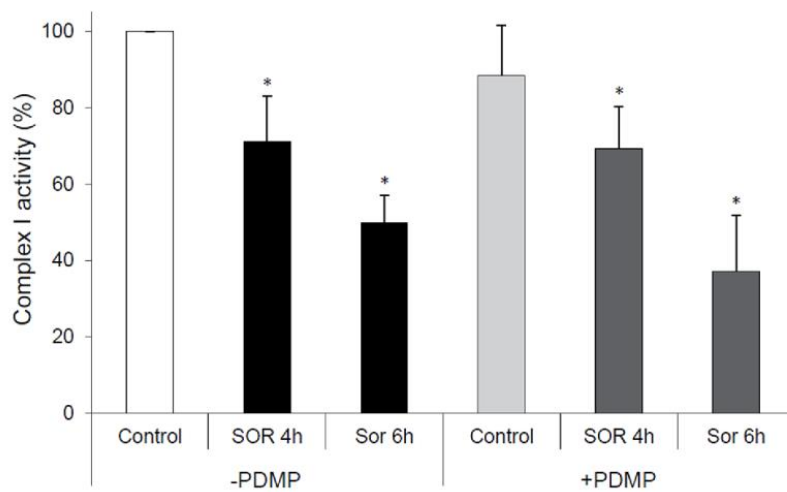
Supplementary Figure S3: Cell viability after sorafenib administration (16 h) in HepG2 cells transfected with siRNA control or against GCS 48 h before. (n=2). *, p<0.05 vs. siCTRL HepG2 cells.



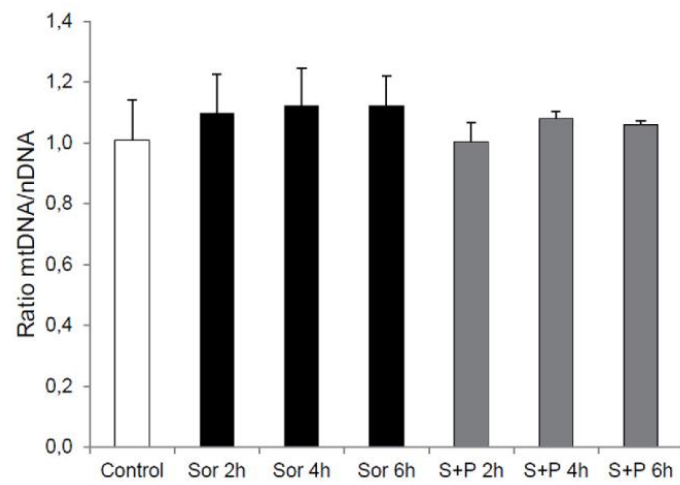
Supplementary Figure S4: Cell viability after sorafenib administration (16 h) in PLC cells transfected with siRNA control or against GCS 48 h before. (n=3). *, p<0.05 vs. CTRL PLC cells.



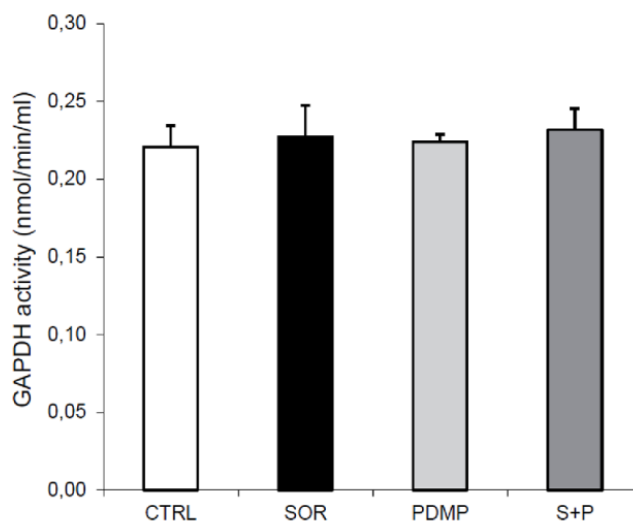
Supplementary Figure S5: Representative experiment measuring cell viability after sorafenib administration in PLC cells treated with vehicle (CTRL) or GCS inhibitor (PDMP) at different doses (50, 75, 100 μM) during 16 hours. (n=2).



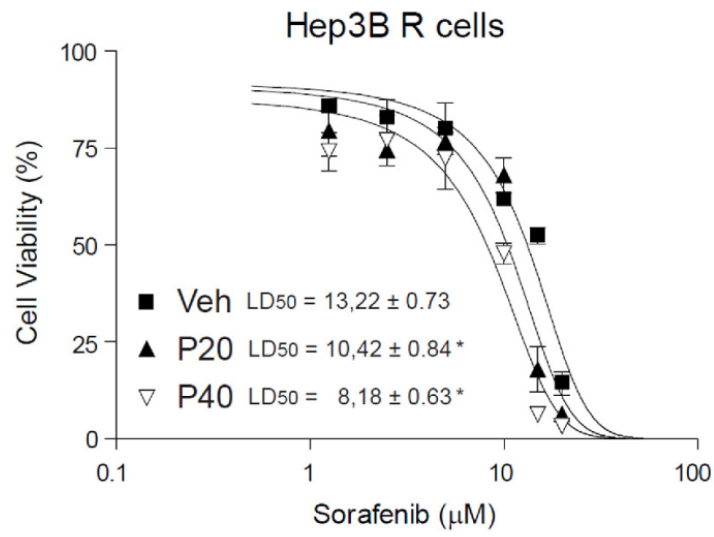
Supplementary Figure S6: Hep3B cells were incubated with sorafenib (10 μ M) in the presence of vehicle (-PDMP) or GCS inhibitor (+PDMP) at 50 μ M, and complex I activity measured in protein extracts obtained at different times (n=3). *, p<0.05 vs. control Hep3B cells.



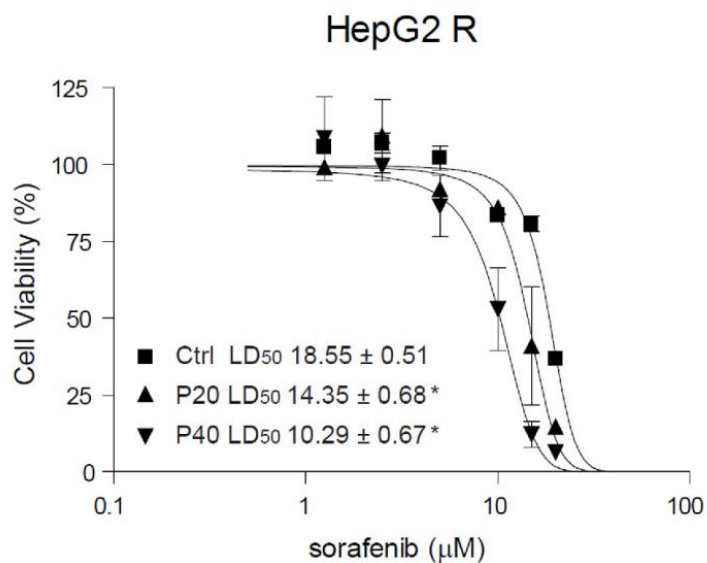
Supplementary Figure S7: Hep3B cells were incubated with sorafenib (10 μ M) in the presence of vehicle (Sor) or GCS inhibitor (S+P) and the ratio between the mitochondrial and nuclear DNA was measured in DNA samples obtained at different times (n=3).



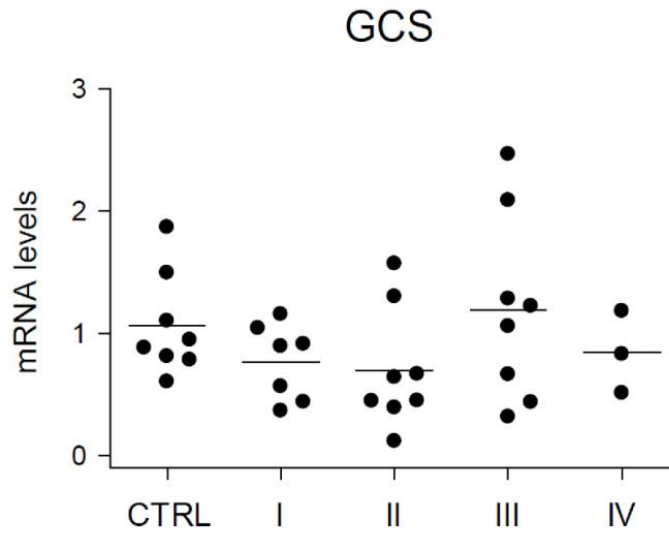
Supplementary Figure S8: GAPDH expression was measured after 6 hours in Hep3B cells treated with sorafenib (10 μ M and/or PDMP combination (50 μ M). (n=3).



Supplementary Figure S9: Dose response analysis of cell viability after sorafenib administration in sorafenib-resistant Hep3B cells treated with vehicle or GCS inhibitor (PDMP) at 20 and 40 μM. (n=3). *, p<0.05 vs. vehicle-treated Hep3B R cells.



Supplementary Figure S10: Dose response analysis of cell viability after sorafenib administration in sorafenib-resistant HepG2 cells treated with vehicle or GCS inhibitor (PDMP) at 20 and 40 μM . ($n=3$). *, $p < 0.05$ vs. vehicle-treated HepG2 R cells.



Supplementary Figure S11: GCS mRNA levels measured in a liver cancer cDNA array (Origene) containing cDNA from normal liver or tumoral tissue from HCC patients. This array covers 8 normal, 7 stage I, 8 stage II, 8 stage IIIA and 3 stage IV pathologist-verified tissues. The results are normalized and validated with β -actin.

Supplementary Table S1: mRNA levels of sphingolipidic enzymes in HepG2 cells after sorafenib exposure

Sorafenib (μM)	0	5
ASMase	1.00 \pm 0.03	1.68 \pm 0.05 *
ACDase	1.00 \pm 0.08	0.76 \pm 0.16
CerS2	1.00 \pm 0.12	0.99 \pm 0.03
GCS	1.00 \pm 0.07	1.83 \pm 0.08 *
SPT	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.06
SK1	1.00 \pm 0.03	0.96 \pm 0.04

HepG2 cells were exposed to sorafenib (5 μ M) for 16 hours and enzymes in ceramide metabolism analyzed by RT-PCR. (n=2). *, p<0.05 vs. control.

Supplementary Table S2: mRNA levels of sphingolipidic enzymes in sorafenib-resistant and sensitive HepG2 cells

	HepG2 S	HepG2 R
ASMase	1.00±0.37	0.60±0.22
ACDase	1.00±0.06	1.39±0.43
CerS2	1.00±0.17	1.19±0.12
GCS	1.00±0.07	1.71±0.38 *
SPT	1.00±0.15	0.95±0.15
SK1	1.00±0.16	1.05±0.72

Ceramide-related enzymes were analyzed by RT-PCR in HepG2 cells that exhibit sorafenib resistance after long-term exposure to sorafenib (HepG2 R) or vehicle (HepG2 S). (n=3). *, p<0.05 vs. control.

Resultados 3. Las proteínas Bcl-2 determinan la resistencia a sorafenib y regorafenib y la eficacia de los miméticos BH3 en el carcinoma hepatocelular.

Tutusaus A; Stefanovic M; Boix L.; Cucarull B.; Zamora A.; Blasco L.; García de Frutos P.; Reig M.; Fernandez-Checa J.C.; Marí M.; Colell A.; Bruix J.; Morales A. **Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma.** Oncotarget. 2018.

Como se ha descrito anteriormente, el sorafenib promueve la producción de ROS y una fuerte pérdida de potencial de membrana mitocondrial induciendo una disfunción mitocondrial que sensibiliza a las células de hepatoma a otros estímulos (410). Esta sensibilización y la disminución de MCL-1, indican que las proteínas de la familia Bcl-2, reguladoras de la apoptosis mitocondrial, podrían ser una buena diana para potenciar el efecto del sorafenib. Se evaluaron diversos inhibidores de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en combinación con el sorafenib y únicamente el ABT-263 consiguió disminuir la viabilidad de células tratadas con sorafenib en tres líneas celulares de hepatoma (Hep3B, HepG2, PLC/PRF5). Esta disminución de la viabilidad, que se confirmó mediante tinciones de cristal violeta tras 3 días de tratamiento, evidencia el efecto potenciador del ABT-263 en células tratadas con sorafenib.

Dado que el ABT-263 inhibe con más afinidad BCL-XL y BCL-2, se examinó el papel individual de estas proteínas en la potenciación del efecto del sorafenib. La inhibición de BCL-XL con A155463 así como su silenciamiento mediante siARN disminuye la viabilidad de las células tratadas con sorafenib, con resultados similares a los del ABT-263. En cambio, no se observa diferencias en la muerte inducida por sorafenib tras el silenciamiento de alrededor de 50% de BCL-2 o mediante la inhibición con el inhibidor específico ABT-199. Por otro lado, el silenciamiento de MCL-1 es suficiente para reducir la viabilidad celular en presencia de ABT-263. Por lo tanto, la disminución de los niveles de MCL-1 por parte del sorafenib y la inhibición de BCL-xL por parte de ABT-263 son imprescindible para la disminución de viabilidad inducida por esta combinación en células de hepatoma.

Una vez demostrado el efecto potenciador del ABT-263, se examinaron las consecuencias de esta combinación. En células Hep3B, los niveles proteicos de BCL-XL y BCL-2 no varían y sólo la expresión de MCL-1 está claramente disminuida por el sorafenib a tiempos cortos. También se observa un aumento de estos niveles de MCL-1 por parte del ABT-263 debido a una estabilización del ARNm y de la proteína como se ha descrito anteriormente (411). Además se observa un aumento de los niveles de BIM en células tratadas con sorafenib así como una disminución de BIM fosforilado, que será degradada, probablemente por la inhibición de quinasas por parte del sorafenib.

Esta inhibición de las proteínas de la familia Bcl-2, inducen rápidamente una muerte apoptótica intrínseca en presencia de sorafenib. Aunque no se observan diferencias en la pérdida de potencial de membrana entre las células tratadas con sorafenib y la combinación, se produce una rápida liberación del citocromo c hacia el citosol. Este aumento de la permeabilidad de la mitocondria producido por el ABT-263 en las células sensibilizadas con sorafenib se traduce en un aumento significativo de la actividad caspasa y de la escisión de PARP1. Además, estas células presentan fragmentación y condensación nuclear en tinciones con Hoechst a partir de las 6 horas.

A continuación, se estudió la relación entre las proteínas de la familia Bcl-2 y la resistencia a sorafenib, muy habitual en CHC. El análisis de la expresión génica en células HepG2 y Hep3B resistentes muestra una expresión elevada de BCL-2 y otras proteínas antiapoptóticas como BCL-B y BFL1 respecto a las líneas sensibles, mientras que MCL-1 está disminuida en las Hep3BR. Por otro lado, la expresión de proteínas proapoptóticas también está alterada en las líneas resistentes: NOXA aumenta significativamente en las Hep3BR

mientras que en las HepG2R tienden a aumentar NOXA y BIM. Estas alteraciones podrían ser las responsables de la evasión de la apoptosis en respuesta a sorafenib mediante mecanismos de adicción a proteínas BCL-2, por lo que el uso de los miméticos BH3 podrían sensibilizar de nuevo estas células resistentes al sorafenib. De hecho, el co-tratamiento con ABT-263 pero no con ABT-199 disminuye la viabilidad en ambas líneas resistentes, revirtiendo así la resistencia a sorafenib.

En general, no se suelen realizar biopsias a los pacientes con CHC avanzado antes de iniciar el tratamiento, lo que dificulta estudiar las alteraciones generadas en el tumor durante el tratamiento. Por ello, se analizaron muestras de tumores en estadios intermedios, así como de pacientes cirróticos por hepatitis C o esteatohepatitis alcohólica. La expresión de BCL-2 respecto al tejido adyacente cirrótico y a hígados sanos está incrementada significativamente en CHC mientras que los niveles de MCL-1 se encuentran disminuidos. Aunque en menor medida, los niveles de BCL-XL también tienden a aumentar en las muestras tumorales. Por lo tanto, los tumores hepáticos presentan alteraciones en la expresión de las proteínas antiapoptóticas, en las que destaca un ratio BCL-2/ MCL-1 elevado respecto al tejido adyacente, lo que indicaría que estos pacientes podrían beneficiarse de una terapia combinada con ABT-263.

En modelos *in vivo* de tumores subcutáneos xenógrafos de HepG2, se reprodujo la eficiencia de la combinación de sorafenib y ABT-263 obteniendo una reducción del crecimiento tumoral y un aumento de las células apoptóticas TUNEL positivas a nivel histológico. Confirmando que el sorafenib produce alteraciones en la expresión de proteínas, los tumores tratados con sorafenib muestran niveles de proteínas antiapoptóticas elevados como BCL-2 o BCL-B, y disminuidos como MCL-1. La combinación sorafenib/ABT-263 también fue eficiente en tumores resistentes a sorafenib, corroborando los resultados *in vitro*.

En otro modelo subcutáneos con la línea BCLC9, con fenotipo de célula madre (412), el ABT-263 redujo eficazmente el crecimiento tumoral en ratones tratados con sorafenib. En este modelo, también se observan alteraciones en el patrón de expresión de Bcl-2 observándose un ratio BCL-2/MCL-1 elevado en tumores tratados con sorafenib. Además, este ratio correlaciona con el crecimiento de estos tumores expresando un valor mayor los tumores que mejor respondían a sorafenib pudiendo servir como marcador de respuesta de la acción del sorafenib en tumores humanos.

Finalmente, se comprobó el efecto del ABT-263 en CHC en combinación con el regorafenib, como tratamiento de segunda línea. El regorafenib *in vitro* también altera la expresión de los genes de Bcl-2 en células de hepatoma y su efecto es potenciado por el ABT-263 desencadenando una muerte apoptótica, como en el caso del sorafenib.

Research Paper

Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma

Anna Tutusaus^{1,2}, Milica Stefanovic¹, Loreto Boix³, Blanca Cucarull^{1,2}, Aynara Zamora¹, Laura Blasco¹, Pablo García de Frutos¹, Maria Reig³, Jose C. Fernandez-Checa^{1,4,5}, Montserrat Mari¹, Anna Colell¹, Jordi Bruix³ and Albert Morales^{1,3}

¹Department of Cell Death and Proliferation, IIBB-CSIC, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Departament de Biomedicina, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

³Barcelona Clinic Liver Cancer Group, Liver Unit, Hospital Clínic of Barcelona, University of Barcelona, CIBEREHD, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁴Liver Unit, Hospital Clinic, CIBEREHD, Barcelona, Spain

⁵Research Center for Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases, Keck School of Medicine of the University of Southern California, Los Angeles, CA, USA

Correspondence to: Albert Morales, **email:** amorales@clinic.ub.es

Keywords: liver cancer; BCL-2 family proteins; BH3-mimetics; mitochondria/apoptosis; sorafenib

Abbreviations: HCC, hepatocellular carcinoma; MMP, mitochondrial membrane potential; MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization; ROS, reactive oxygen species; WT, wild type

Received: November 30, 2017

Accepted: February 26, 2018

Published: March 30, 2018

Copyright: Tutusaus et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Sorafenib, systemic treatment for advanced hepatocellular carcinoma (HCC), and regorafenib, novel second line treatment after sorafenib failure, have efficacy limited by evasive mechanisms of acquired-drug resistance. BCL-2 proteins participate in the response to tyrosine kinase inhibitors; however, their role in HCC therapy with sorafenib/regorafenib remains uncertain. BH3-mimetic ABT-263 (navitoclax) enhanced sorafenib activity, inducing cell death via a mitochondrial caspase-dependent mechanism, after BCL-xL/BCL-2 inhibition. Sorafenib-resistant hepatoma cells (HepG2R and Hep3BR) exhibited altered mRNA expression of BCL-2 and other anti-apoptotic family members, such as MCL-1, priming drug-resistant cancer cells to death by BH3-mimetics. ABT-263 restored sorafenib efficacy in sorafenib-resistant cell lines and HCC mouse models. Moreover, in mice xenografts from patient-derived BCLC9 cells, better tumor response to sorafenib was associated to higher changes in the BCL-2 mRNA pattern. HCC non-treated patients displayed altered BCL-2, MCL-1 and BCL-xL mRNA levels respect to adjacent non-tumoral biopsies and an increased BCL-2/MCL-1 ratio, predictive of navitoclax efficacy. Moreover, regorafenib administration also modified the BCL-2/MCL-1 ratio and navitoclax sensitized hepatoma cells to regorafenib by a mitochondrial caspase-dependent mechanism. In conclusion, sorafenib/regorafenib response is determined by BCL-2 proteins, while increased BCL-2/MCL-1 ratio in HCC sensitizes drug resistant-tumors against ABT-263 co-administration. Thus, changes in the BCL-2 profile, altered in HCC patients, could help to follow-up sorafenib efficacy, allowing patient selection for combined therapy with BH3-mimetics or early switch them to second line therapy.

INTRODUCTION

Hepatocellular carcinoma (HCC), the most common liver cancer [1], is often diagnosed at an advanced stage with poor prognosis. Its expected incidence increases due to the growing prevalence of non-alcoholic fatty liver disease associated to obesity and metabolic syndrome [2]. Despite several key therapeutic advancements the sole systemic agents with survival benefit are the multikinase inhibitors sorafenib [3] and regorafenib [4]. Unfortunately, the activity of these drugs is limited by primary and acquired drug resistance mechanisms [5, 6]. Thus, there is need to develop additional therapeutic agents to further enhance the still limited survival of the patients. The mechanisms for sorafenib and regorafenib escape are not well known. The role of cell death-related pathways involving mitochondria is gaining interest as an alternative approach to target cancers where the dependence on specific driver mutations for survival is not established. In this sense, HCC is a tumor with a complex genetic background where clear druggable addictions have not been validated.

The BCL-2 family proteins control apoptosis at the mitochondria by regulating mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP) by multidomain proapoptotic BAX and BAK. MOMP results in the cytosolic release of proapoptotic mitochondrial intermembrane space proteins such as cytochrome c and smac/DIABLO, leading to caspase activation and rapid cell death [7, 8]. Given this pivotal role, MOMP is highly regulated, mostly by pro- and anti-apoptotic members of the BCL-2 protein family. Among them, some BH3-only proteins directly activate BAX and BAK, such as BID, BIM, and PUMA, while others inactivate the multidomain anti-apoptotic BCL-2, BCL-XL, and MCL-1, such as BAD and NOXA. Multiple insults favor the MOMP and change the delicate balance established between activators and repressors of BAX/BAK homo-oligomerization, resulting in cell death or in the appearance of drug resistance. BCL-2 family proteins and the mitochondrial-dependent apoptotic program have been previously reported as main components of the sorafenib cytotoxicity in hepatoma cells [9–14]. MCL-1 depletion and BAX mitochondrial translocation [9, 11], BAD increase [12], BIM status [13], mitochondrial oxidative stress accumulation [11, 14], are frequently observed after sorafenib exposure. Increased BCL-2 family members, particularly BCL-xL levels have been connected to HCC growth [15] and sorafenib-resistance [16], validating the mitochondrial pathway as highly relevant in sorafenib therapy for HCC. This link was further demonstrated by the increased antitumoral activity registered when combining the BH3-mimetic ABT-737 with sorafenib [13, 17].

Specific BCL-2 profiles that sensitize or provide therapeutic resistance against particular chemotherapeutic agents have been recently identified [18–22]. Novel

strategies, based on ectopic expression and genetic/pharmacological repression of specific BCL-2 proteins [23, 24], “mito-prime” cancer cells against drug treatments [25]. However, neither a specific signature in BCL-2 proteins has been associated to sorafenib response, nor mitochondrial “priming for death” defined after sorafenib exposure. Interestingly, several BH3-mimetics that interact with specific BCL-2 family proteins have been identified and studied in on-going clinical trials. Consequently, we aimed to evaluate the occurrence of BCL-2 addiction in the sorafenib resistance displayed by HCC tumors, and to determine whether BH3-mimetics could take advantage of this mitochondrial adaptation during sorafenib treatment.

RESULTS

ABT-263 potentiates sorafenib activity on hepatoma cell lines

Our previous work [11] prompted our interest in searching therapeutic strategies that benefit from sorafenib cytotoxic effects in mitochondria. Taking advantage of this mitochondrial sensitization, BH3-mimetics could interact with anti-apoptotic BCL-2 family members to increase sorafenib efficacy in hepatoma cells. Hep3B, HepG2 and PLC5 cells were treated with navitoclax (ABT-263) a specific BCL-2 and BCL-xL inhibitor in clinical study and exposed to sorafenib to test their efficacy (Figure 1A–1C). ABT-263 potentiated the cytotoxic sorafenib effect in all hepatoma cell lines tested (Figure 1A–1C). To verify that navitoclax was our best option, we tested other reported BH3-mimetics and, although all compounds increased cell death to some extent, ABT-263 was clearly more efficient in combination with sorafenib on hepatoma cells (Supplementary Figure 1). After three days exposure, Hep3B, HepG2 and PLC5 cells treated with navitoclax were visibly sensitized to sorafenib (Figure 1D–1F), reproducing in crystal violet assays the MTT findings. This combined activity, in line with previous observations [16, 26], evidenced that ABT-263 is a potent sensitizer for sorafenib action in HCC cell lines.

Since ABT-263 effect on sorafenib efficacy is expected due to its sequestration of intracellular BCL-2 and BCL-xL, we analyzed the effect of separately targeting both proteins. First, the FDA-approved BCL-2 inhibitor ABT-199, even when used at high doses (0.1–5 μ M), was unable to potentiate sorafenib activity in Hep3B cells (Figure 2A) or in HepG2 cells (Supplementary Figure 2). In contrast, the potent and selective BCL-xL inhibitor A-1155463 exhibited similar efficacy than the observed after navitoclax administration (Figure 2B). Supporting these observations, BCL-xL mRNA reduction (72 \pm 5% knockdown), via siRNA transfection in Hep3B cells, recapitulated the increased sorafenib effect induced by navitoclax (Figure 2C). However, BCL-2 reduction (64 \pm 10% knockdown) did not significantly sensitize

against sorafenib, while co-silencing BCL-2/BCL-xL was equally effective (not shown here).

Therefore, the well-known decrease of MCL-1 induced by sorafenib [11, 16], combined to BCL-xL/BCL-2 reduction by RNA silencing or ABT-263 treatment, could be enough to cause hepatoma cell death as previously reported [16, 26]. Confirming this hypothesis, MCL-1 targeting was highly effective to kill Hep3B and HepG2 cells exposed to ABT-263 (Figure 2D, E). In sum, these experiments illustrate the ability of individual changes in BCL-2 family proteins to modulate sorafenib efficacy in hepatoma cells.

BCL-2, MCL1 and BCL-xL mRNA levels are altered in tumoral tissue from HCC patients

At this point, it would be interesting to analyze in human biopsies BCL-2, MCL-1 or BCL-xL levels during follow-up to test their correlation with the tumor response under sorafenib. Unfortunately, sorafenib treatment is delivered to patients with advanced hepatocellular carcinoma that are not routinely biopsied just prior to treatment. To gain some insight into the expression pattern of BCL-2 family protein, we tested in untreated HCC samples (<5cm) without vascular invasion (I-II TNM stage) from Ethanol/HCV cirrhotic patients (n=12) for mRNA changes respect to adjacent non-

tumoral biopsies (n=12) and to healthy livers (n=10), as detailed in Supplementary Figure 3. HCC biopsies exhibited enhanced BCL-2 and decreased MCL-1 levels compared to control livers (Figure 3A, B). In addition, some individuals exhibited increased BCL-xL levels in cirrhotic or tumoral areas (Figure 3C). The BCL-2/MCL-1 ratio has been proposed as predictor of *in vitro* sensitivity to navitoclax in human myeloma cell lines [22]. Interestingly, a significant increase in BCL-2/MCL-1 was displayed by HCC samples, that was not presented by the neighboring cirrhotic tissue (Figure 3D), suggesting that this modification could be associated to tumor development.

BCL-2 protein alteration during sorafenib resistance renders hepatoma cells sensitive to ABT-263 administration

After long-time exposure to sorafenib, we analyzed in sorafenib-resistant HepG2 and Hep3B cells if mRNA changes in anti-apoptotic BCL-2 related proteins could be induced by sorafenib resistance, and provide clues about potential BH3-mimetic uses. A significant BCL-2 increase was observed in both resistant cell lines, respect to their parental cells (Figure 4A). Particularly, an enhanced BCL-2/MCL-1 ratio (5.4±0.9 and 2.9±0.7, respectively) was detected. Minor changes in BCL-2/MCL-1 protein levels

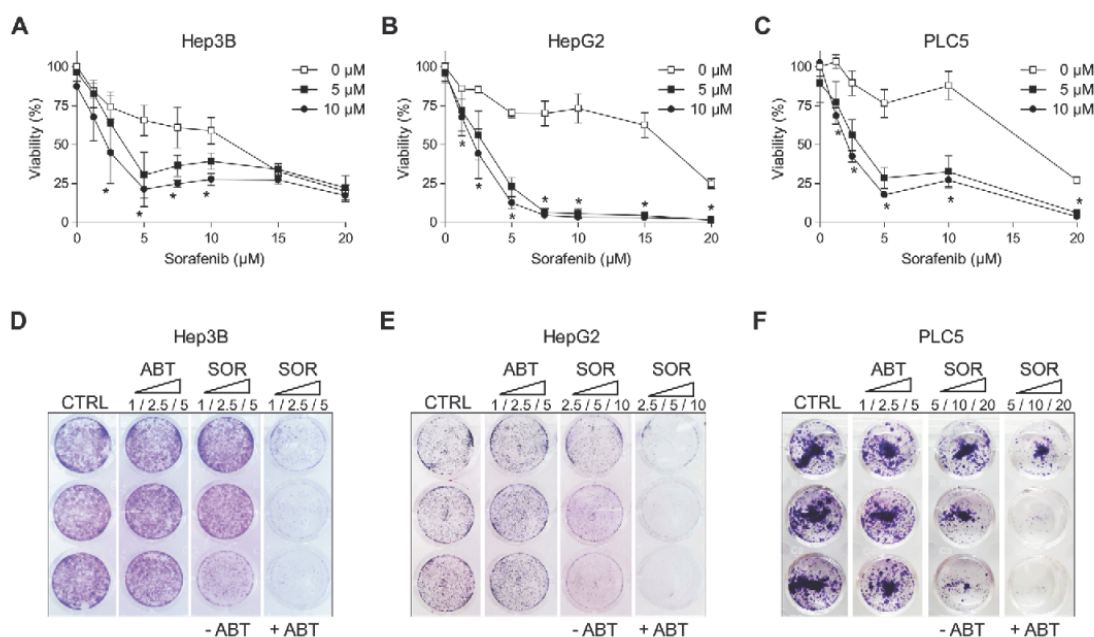


Figure 1: ABT-263 potentiated sorafenib cytotoxicity against different hepatoma cell lines. (A-C) MTT assays to test ABT-263 effect on sorafenib cytotoxicity in different liver cell lines (Hep3B, HepG2 and PLC5). **(D-F)** Crystal Violet staining was performed after 3 days exposure of sorafenib/ABT-263 in Hep3B, HepG2 and PLC5 cell cultures. (n=3) *P < 0.05 vs. control.

were detected in HepG2 R and Hep3B R (2.2 ± 0.4 and 1.4 ± 0.3) by western blot (Figure 4B), suggesting mRNA analysis as more sensitive indicator of anti-apoptotic BCL-2 modifications in our samples.

In addition, changes in pro-apoptotic BCL-2 family members were also detected in resistant cell lines. Particularly in Hep3B cells, an important alteration in several BCL-2-related mRNAs was caused by drug-exposure. Analogous alterations in the BCL-2 network, recently observed in other cellular settings [23], have been postulated to create a BCL-2 addiction used by BH3-mimetics to eliminate tumor cells. In agreement, sorafenib-resistant cells Hep3B were sensitive to ABT-263 alone (Figure 4C), while BCL-xL inhibitor A-1155463 did not kill resistant hepatoma cells preferentially, as observed in Hep3B R (Figure 4D) and HepG2 R cells (Supplementary Figure 4).

Furthermore, navitoclax overcame sorafenib resistance in both hepatoma cell lines (Figure 4E, F), while BCL-2 inhibitor ABT-199 did not (Supplementary Figure 5). These results indicate that, although changes in BCL-xL have not been observed in HCC tumors or after sorafenib-exposure, basal BCL-xL levels should be playing an important role in hepatoma cells. Similarly sensitization by navitoclax was observed in crystal violet assays, underscoring the requirement for the simultaneous

BCL-2/BCL-xL inhibition to counteract sorafenib-resistance.

ABT-263 triggered mitochondrial-dependent apoptotic cell death after sorafenib exposure in hepatoma cell lines

ABT-263 is a potent BH3-mimetic that selectively inhibits BCL-xL and BCL-2. Thus, we expected that sorafenib-induced mitochondrial membrane permeabilization, and consequent release of intermembrane proteins such as cytochrome c, could be accelerated by ABT-263. Among main anti-apoptotic BCL-2 proteins, only MCL-1 was obviously affected by short-time sorafenib exposure, while no evident changes in BCL-2 or BCL-xL were detected (Figure 5A). In parallel, an increased in pro-apoptotic BIM levels was induced in sorafenib-treated samples, probably due to the minor phospho-BIM levels, and consequent proteosomal degradation, caused by sorafenib. Interestingly, PARP-1 cleavage was early identified suggesting that ABT-263 initiated cell death in sorafenib treated cells following MCL-1 levels depletion and BIM increase.

Similar to the timing of PARP-1 degradation, Hep3B cells pretreated with navitoclax exhibited a quick mitochondrial release of cytochrome c (Figure 5B),

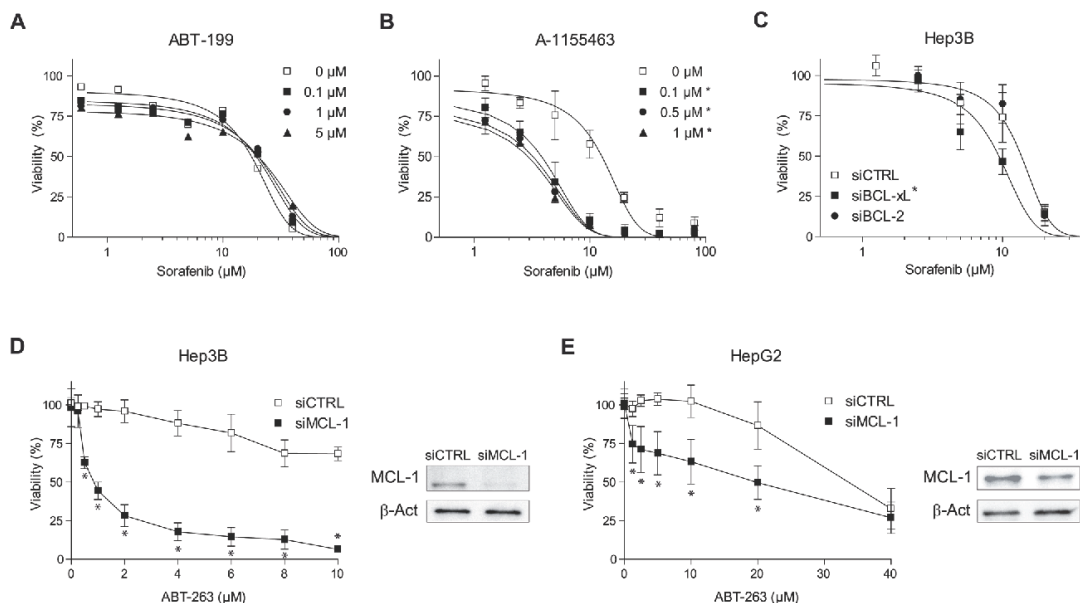


Figure 2: Sorafenib and ABT-263 activity on hepatoma cells depend on anti-apoptotic BCL-2 protein levels. (A and B) Cell viability of Hep3B cells treated with specific inhibitors ABT-199 (BCL-2) and A-1155463 (BCL-xL) were tested in combination with sorafenib (μM). (C) Cell viability of Hep3B cells transfected with siRNAs control and against BCL-2 or BCL-xL, and treated with sorafenib. RNA interference was validated by qPCR. * $P < 0.05$ vs. control or siCTRL cells. (D and E) Hep3B and HepG2 cells were transfected with siRNAs control and against MCL-1 and treated and MTT assays performed after ABT-263 exposure. In parallel panels, protein levels of MCL-1 and β -actin are showed. (n=3) * $P < 0.05$ vs. control or siCTRL cells

(Figure 5B) while no cytosolic increase in this apoptogenic protein was detected after 2-6 hours of sorafenib exposure. Similar patterns of cytochrome c and rapid PARP-1 cleavage after ABT-263 incubation were observed in sorafenib-treated HepG2 and PLC5 cells, (Supplementary Figure 6). Incidentally, no additional reduction in mitochondrial membrane potential or ATP levels were noticed in sorafenib-treated cells after navitoclax administration (Supplementary Figure 7).

Sorafenib is an inducer of autophagy, which could preserve survival after cytochrome c release in the absence of caspase activation [27]. To verify that the MOMP was leading to apoptotic cell death by a caspase-dependent mechanism, we measured caspase-3 activity. A remarkable increase in caspase-3 activity was detected following ABT-263 addition to sorafenib-treated hepatoma cells (Figure 5C), paralleling the PARP proteolysis previously observed. Consistent with an apoptotic sequence of events,

an evident nuclear condensation and fragmentation was visualized in sorafenib-treated cells incubated with navitoclax (Figure 5D). Of note, the pre-addition of a pancaspase inhibitor Z-VAD-FMK (z-VAK) significantly reduced the amount of apoptotic Hep3B cells (8.5 ± 2.0 vs. 24.5 ± 4.1) counted after the ABT-263/sorafenib combination (Figure 5E).

Sorafenib modifies the BCL-2 system in HCC mouse models and benefits from ABT-263/sorafenib co-administration

HepG2 cells were subcutaneously inoculated in nude mice and treated with sorafenib, ABT-263 or the combination of both drugs. HepG2 tumors treated with ABT-263/sorafenib exhibited minor tumor growth (Figure 6A) and increased cell death, as visualized by TUNEL staining (Figure 6B), and quantified (Figure

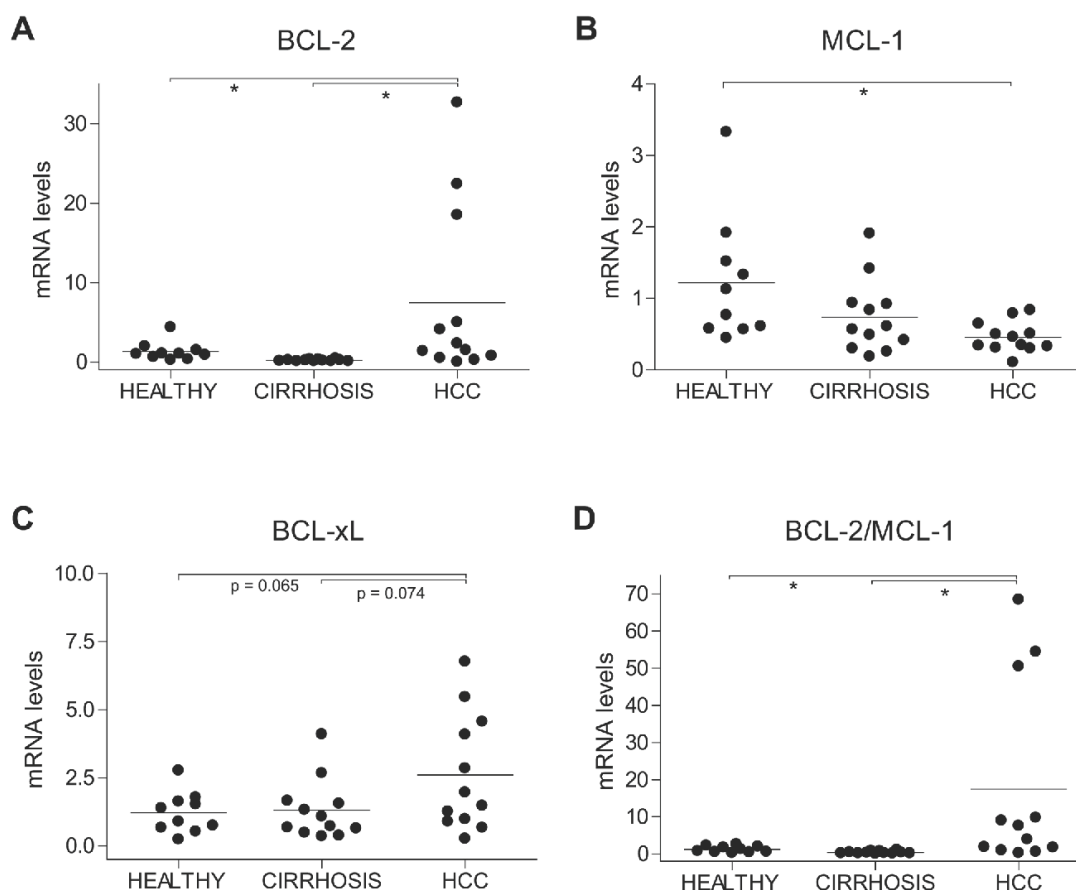


Figure 3: Alterations in BCL-2, MCL-1 and BCL-xL mRNA levels in HCC patients. (A) BCL-2, (B) MCL-1, (C) BCL-xL and (D) BCL-2/MCL-1 mRNA levels were measured by qPCR in healthy liver (n=10) and in cirrhotic and tumoral tissue from HCC patients (n=12) with HCV/EtOH etiology. * $P < 0.05$.

6C). The anti-apoptotic BCL-2 protein system was analyzed in sorafenib-treated tumors. Enhanced mRNA levels of BCL-2 (3.0 ± 0.8) and BCL-2/MCL-1 (3.4 ± 0.7) ratio compared to vehicle-tumors

(Figure 6D) were detected; supporting that sorafenib exposure is triggering a BCL-2 profile alteration. Accordingly, when injecting sorafenib-resistant HepG2 cell subcutaneously to mice, the tumors recovered

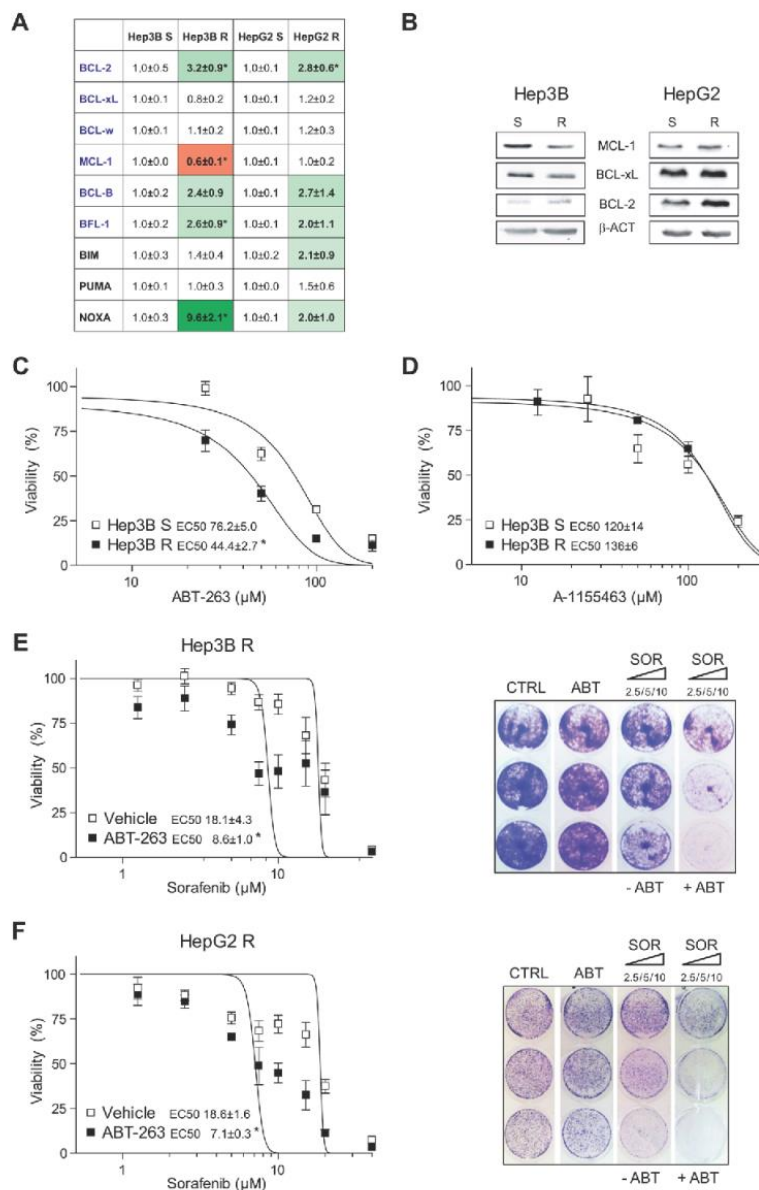


Figure 4: Sorafenib-resistant hepatoma cells exhibit mRNA changes in BCL-2 proteins and are re-sensitized to sorafenib by ABT-263 exposure. (A) mRNAs levels of different BCL-2 family proteins from sorafenib sensitive (S) and sorafenib resistant (R) Hep3B and HepG2 cells. * $P < 0.05$ vs. sensitive hepatoma cells. (B) Representative western blot images of MCL-1, BCL-xL, BCL-2 and β -Actin protein levels exhibited by Hep3B and HepG2 sorafenib sensitive (S) and sorafenib resistant (R) cells. (C) Effect of ABT-263 in sensitive and sorafenib-resistant Hep3B cells. * $P < 0.05$ vs. sensitive cells. (D) Effect of A-1155463 exposure to sensitive and sorafenib-resistant Hep3B cells. (E-F) Effect of ABT-263 administration on sorafenib response in sorafenib-resistant Hep3B and HepG2 cells, measured by MTT assay. * $P < 0.05$ vs. vehicle-treated cells. Representative Crystal violet staining images. (n=3).

sensitivity to sorafenib exposure when the animals were gavaged simultaneously with sorafenib and ABT-263 (Figure 6E, 6F). Neither sorafenib nor navitoclax alone (data not shown) reduced tumor growth.

Sorafenib alters the antiapoptotic BCL-2 profile predicting tumor response *in vivo*

To verify these observations we used the anchor-free growing human hepatocellular carcinoma cells. BCLC9 cells, established from a well-differentiated human HCC, exhibit a stem cell phenotype and are highly efficient tumor initiating cells in nude mice [28]. Mimicking the results obtained in mice bearing HepG2 tumors, ABT-263 was highly effective reducing the growth of BCLC9 tumors treated with sorafenib (Figure 7A). No hepatic damage was caused, as denoted by lack of variations in serum ALT/AST levels (data not shown) and H&E staining of liver biopsies (Figure 7B).

Once again, an altered BCL-2 protein pattern was observed upon sorafenib exposure. Interestingly, when we analyzed the BCL-2/MCL-1 ratio, predictive value of the observed ABT-263 efficacy (Figure 7C), we distinguished a parallelism between tumor growth and BCL-2/MCL-1 levels among sorafenib-only treated tumors (n=11). BCLC9 tumors more sensitive to sorafenib (green squares) displayed higher BCL-2/MCL-1 ratios compared to more resistant tumors (red squares) where sorafenib was less effective (Figure 7C). Sorafenib-treated BCLC9 tumors not only up-regulated anti-apoptotic BCL-2 proteins such as BCL-2 or BCL-w, but also increased other pro-apoptotic BCL-2 members such as BIM, with higher values associated to better sorafenib response (Figure 7D). In addition, a good correlation was found between BCL-2/MCL-1 expression and sorafenib-induced cytotoxicity (0.938, Pearson coefficient) in the hepatoma cell lines examined (Supplementary Figure 8), maybe supporting this ratio also as indicative of sorafenib efficacy.

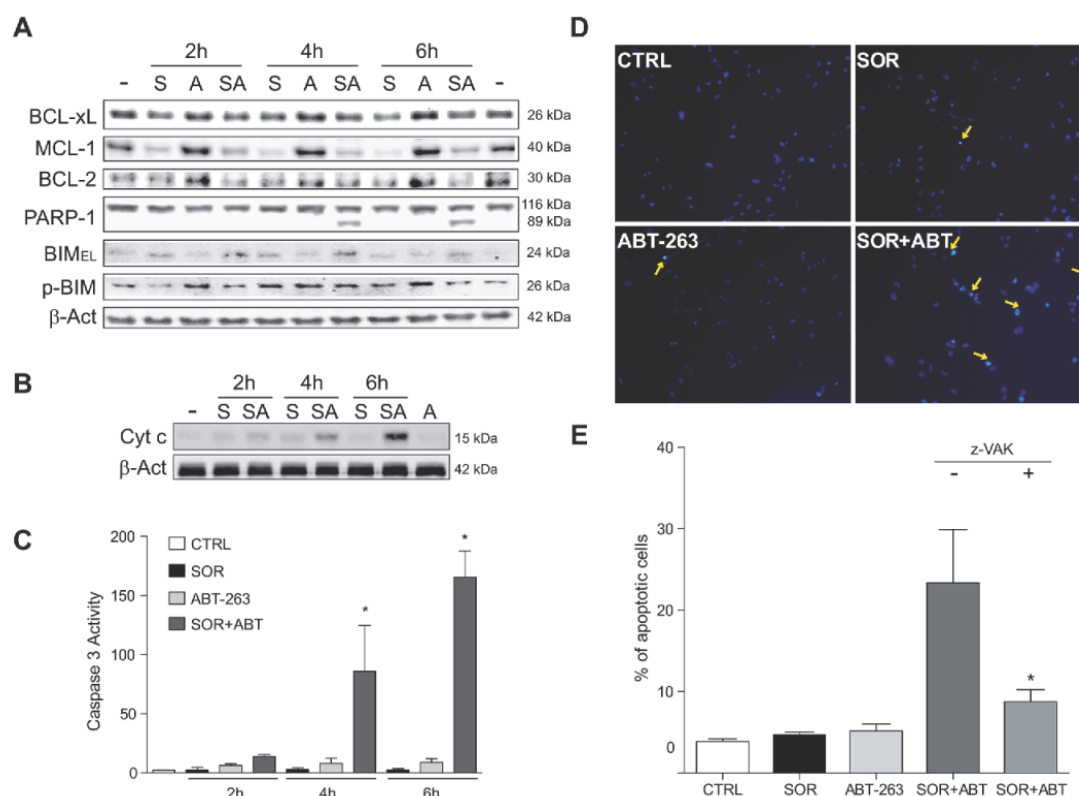


Figure 5: Sorafenib/ABT-263 combination induced apoptotic cell death via a mitochondrial caspase-dependent mechanism. (A) Hep3B cells were exposed to sorafenib (S, 10 μM) with or without ABT-263 (A, 5 μM) and expression levels of indicated proteins were analyzed by Western blot, using β-actin as a loading control. (B) cytochrome c levels were analyzed by western blot in the cytosol of Hep3B cells at different times, and (C) fold increase in caspase-3 activity was determined in total cell extracts as above. (D-E) Nuclear Hoechst 33258 staining was visualized in Hep3B cells treated with sorafenib and/or ABT-263, and apoptotic positive cells counted in 10 independent fields per condition. (n=3) *P < 0.05 vs. control Hep3B cells.

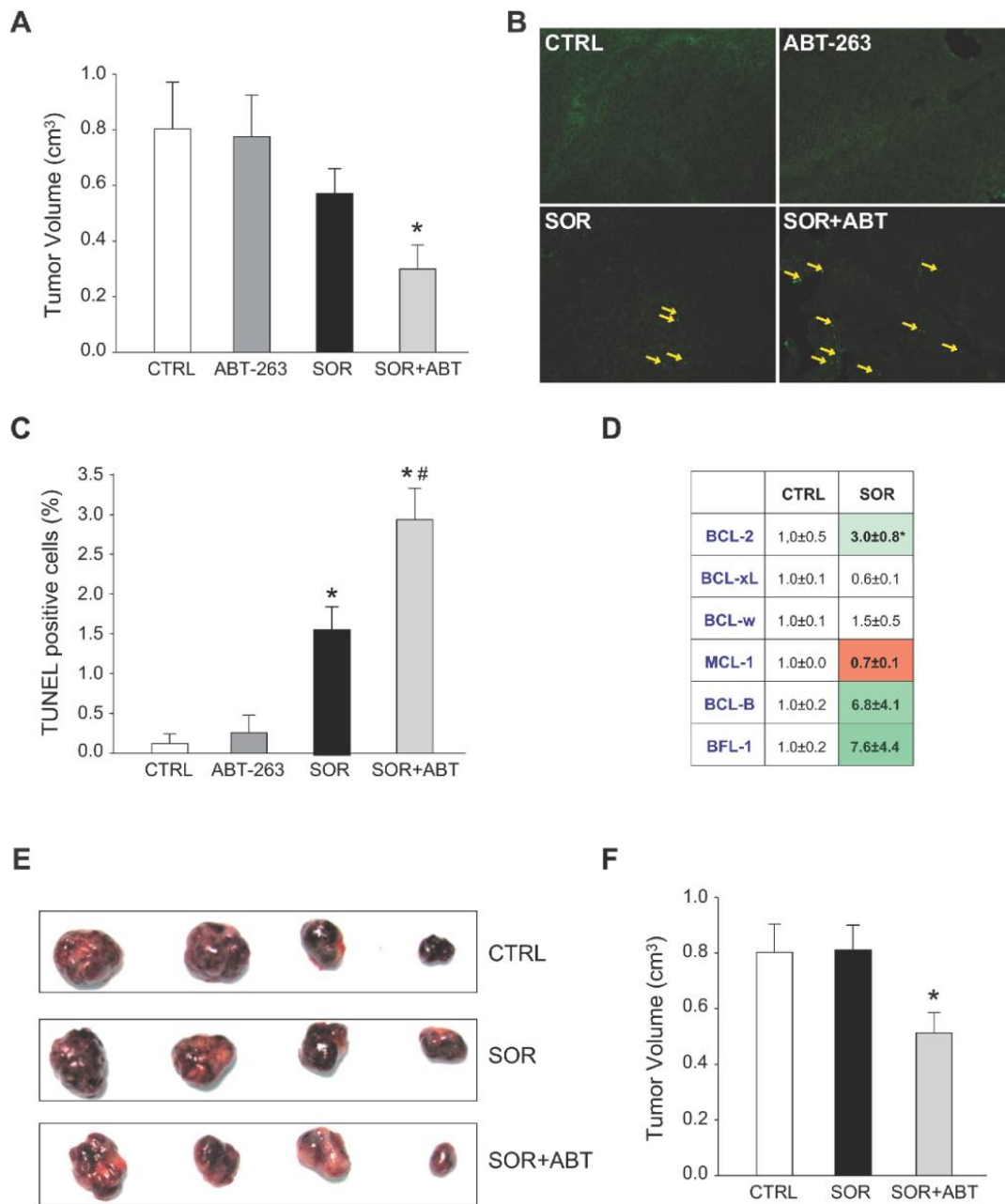


Figure 6: Sorafenib altered the mRNA BCL-2 pattern *in vivo* and ABT-263 increases sorafenib efficacy in murine subcutaneous HepG2 models. (A) Tumor growth in mice bearing HepG2-subcutaneous tumors that were given orally ABT-263 (100 mg/kg) and/or sorafenib (80 mg/kg) daily for 3 weeks (CTRL, n=6; ABT, n=3; SOR, n=6; SOR+ABT, n=8). **P* < 0.05 vs. vehicle-treated mice. (B-C) Representative images of tumor samples stained for TUNEL detection and graphic quantification. (D) Representation of anti-apoptotic BCL-2 mRNAs levels in HepG2 tumors treated with vehicle or sorafenib. Subcutaneous tumor samples were obtained from mice gavaged with vehicle (CTRL) or sorafenib (SOR) daily for 3 weeks. **P* < 0.05 vs. vehicle-treated tumors. (E-F) Representative images and tumor growth quantification of sorafenib-resistant HepG2 tumors in mice treated orally with sorafenib (80 mg/kg) and ABT-263 (100 mg/kg) for 3 weeks (n=6). **P* < 0.05 vs. vehicle-treated mice.

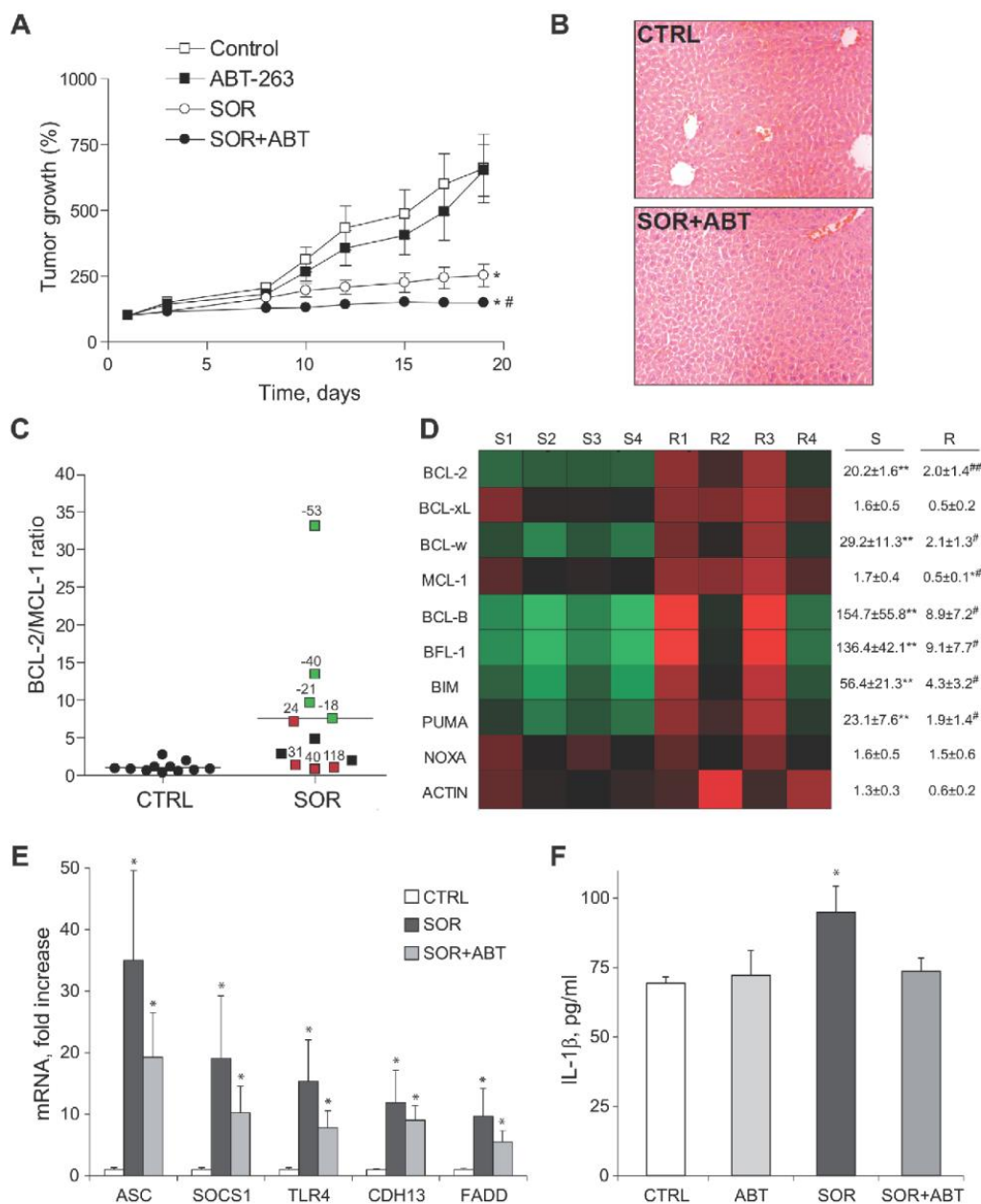


Figure 7: ABT-263 potentiated sorafenib effectiveness in an experimental HCC model, being changes in the BCL-2 profile indicative of sorafenib response. (A) Tumor growth in mice bearing BCLC9-subcutaneous tumors that were daily gavaged with ABT-263 (100 mg/kg) and/or sorafenib (80 mg/kg) (CTRL, n=12; ABT, n=6; SOR, n=11; SOR+ABT, n=8). **P* < 0.05 vs. vehicle-treated mice. #*P* < 0.05 vs. sorafenib-treated mice. (B) Representative H&E liver images from vehicle and sorafenib/ABT-263 treated mice. (C) BCL-2/MCL-1 mRNA ratio of BCLC9 tumors treated with vehicle (CTRL) or sorafenib (SOR). Samples in green exhibited increased sorafenib efficacy, while tumors in red were less responsive (% respect to median growth). (D) Representation of mRNA changes in members of BCL-2 family exhibited by sensitive (S1 to S4) and resistant (R1 to R4) BCLC9 tumors following sorafenib administration. **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs. vehicle-treated tumors. #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs. sorafenib-sensitive tumors. (E) mRNA levels of ASC, SOCS1, TLR4, CDH13 and FADD in tumors from mice treated with vehicle, sorafenib or sorafenib/ABT-263 (n=4). (F) Serum levels of human IL-1β in mice as above. **P* < 0.05 vs. vehicle-treated mice.

Sorafenib-induced inflammation is reduced by navitoclax co-administration

Finally, we analyzed the modification of cellular pathways involved in liver cancer in sorafenib-treated BCLC9 tumors using a gene array. When we focused on mRNAs presenting major upregulation following sorafenib exposure, we detected an increase in genes associated to inflammasome activation and inflammatory response such as TLR4 and ASC, among others (Figure 7E). As readout of inflammasome induction we checked for serum IL-1 β levels in the treated animals. IL-1 β was significantly increased in the serum of BCLC9-bearing mice treated with sorafenib (Figure 7F). This relationship inflammation/tumor growth is consistent with the observation that inflammatory side effects related to sorafenib administration, such as dermatology hand-food-skin reaction, are associated to slower tumor growth and improved survival. Interestingly, ABT co-administration potentiated cell death and reduced tumor growth without additional inflammatory reaction. On the contrary, decreased IL-1 β circulatory levels were exhibited by mice receiving sorafenib/ABT-263 suggesting the possibility of achieving increase sorafenib activity, not linked to enhanced inflammation.

Regorafenib modifies the BCL-2/MCL-1 ratio in hepatoma cells and ABT-263 co-addition induces mitochondrial caspase-dependent death

Since regorafenib has been approved as second line treatment for HCC progressing after sorafenib, we analyzed if navitoclax could also potentiate regorafenib activity. First, we measured mRNA changes in the BCL-2/MCL-1 ratio. In HepG2 cells, regorafenib highly increased the BCL-2/MCL-1 levels after 10 hours (15.6 \pm 4.8 fold increase), while a 5.4 \pm 1.2 fold increase was observed in Hep3B cells. Consistently, ABT-263 greatly sensitized HepG2 cells to regorafenib (Figure 8A), and had significant effects on Hep3B cells (Figure 8B). As soon as 4 hours after regorafenib exposure, MCL-1 levels were reduced in HepG2 cells, probably due to an increase proteasomal degradation induced by regorafenib ERK inhibition [29], mechanism also relevant in sorafenib action as observed before. Moreover, ABT-263 co-administration induced cytosolic cytochrome c released and PARP-1 cleavage (Figure 8C), and a moderate increase in BIM levels was detected. Similar effects were observed in Hep3B cells (data not shown), inducing obvious apoptotic features as denoted by caspase-3 activity (Figure 8D), Hoechst staining (Figure 8E) and apoptotic cell counting (Figure 8F).

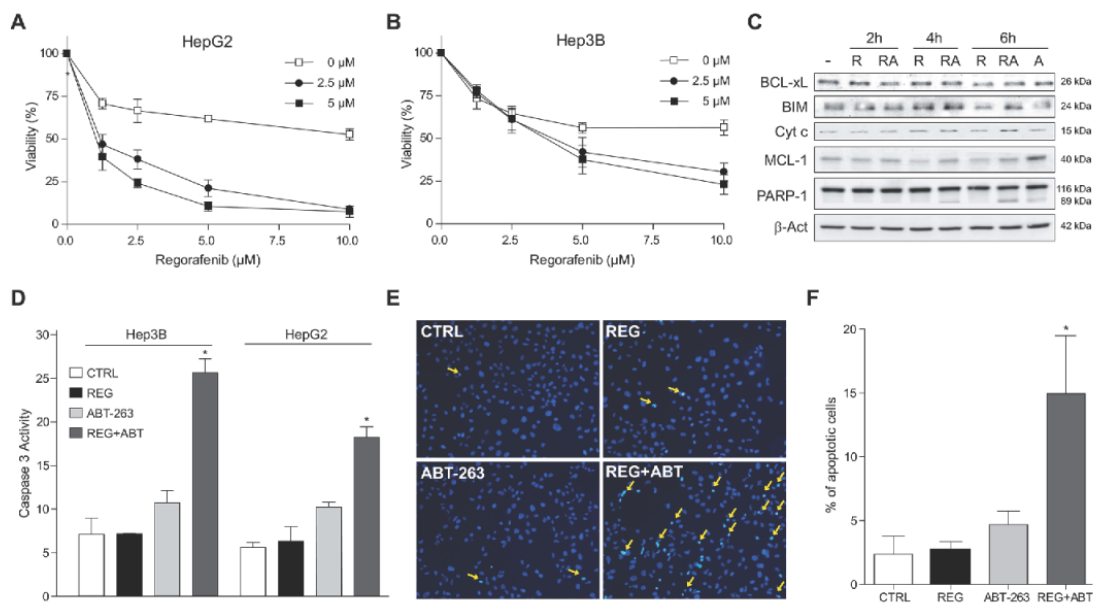


Figure 8: Regorafenib/ABT-263 combination induced apoptotic cell death via a mitochondrial caspase-dependent mechanism. (A-B) HepG2 and Hep3B cells were exposed to regorafenib/ABT-263 and MTT viability measured after 16 h. (C) cytochrome c levels were analyzed by western blot in the cytosol and BCL-xL, BIM, MCL-1 and PARP-1 in total extracts from hepatoma cells treated with regorafenib (5 μM) and/or ABT-263 (5 μM). (D) fold increase in caspase-3 activity was determined in total cell extracts as above. (E-F) Nuclear Hoechst 33258 staining was visualized in Hep3B cells treated with regorafenib and/or ABT-263, and apoptotic positive cells counted in 10 independent fields per condition. (n=3) *P < 0.05 vs. control cells.

DISCUSSION

Sorafenib, drug recommended as first-line of treatment for HCC patients [3, 30], requires assistance to completely halt HCC progression. Although immune checkpoint inhibition could be helpful [31], so far less than 25% of HCC patients exhibit a molecular signature that could be linked to objective response to immune-targeted therapy [32]. Therefore, we still need early markers of sorafenib efficacy or failure. Quantifying BCL-2 family members in sorafenib HCC therapy, aligns with proposed determinations of mRNA and protein BCL-2 profile [19–22, 33, 34] as indicative of treatment efficacy in colorectal cancer, lymphoid and myeloid leukemia, among others. Currently, profiling by tumor biopsy has no impact in HCC clinical decision-making and most patients are diagnosed by using imaging criteria [35]. Our work supports the analysis of BCL-2 family proteins in patients undergoing treatment, as potential tool to stratify them according to expected evolution under sorafenib.

The approval of regorafenib as second line drug after sorafenib treatment [4] underscores the clinical relevance of techniques to promptly switch patients from first line to second line therapy. Our *in vitro* data indicates that regorafenib also increases the BCL-2/MCL-1 ratio and ABT-263 administration is able to sensitize hepatoma cells

against regorafenib. An altered BCL-2 pattern, present in HCC biopsies, may also be indicative of regorafenib response and of BH3-mimetics capacity to potentiate regorafenib activity. Besides immunotherapy, novel targets for sorafenib acquired resistance are proposed, such as Focal Adhesion Kinase [36], ceramide generation [11] or Metallothionein-1G [37]. In the absence of surrogate serum markers, biopsies of sorafenib-treated tumors will help to validate them, increasing our knowledge of HCC vulnerabilities.

Beyond the predictive value of BCL-2 profile in sorafenib/regorafenib efficacy, BH3 mimetics are interesting compounds in combination with sorafenib, since sorafenib resistance could be generating a targetable BCL-2 addiction (Figure 9). Most common mutations in HCC, such as p53 and beta-catenin, are undruggable. Therefore, new targetable proteins are required to improve HCC management. In this sense, several BH3 mimetics are already in clinical trials, and others, as BCL-xL inhibitors, are under scrutiny for cancer treatment as the biomedical importance of this pathway has been unveiled [38, 39]. Among them, venetoclax (ABT199) recently approved for leukemia therapy [40] and reported to cause minor side effects on treated patients appears highly promising [41]. Unfortunately, it does not seem to be effective in combination with sorafenib in HCC treatment

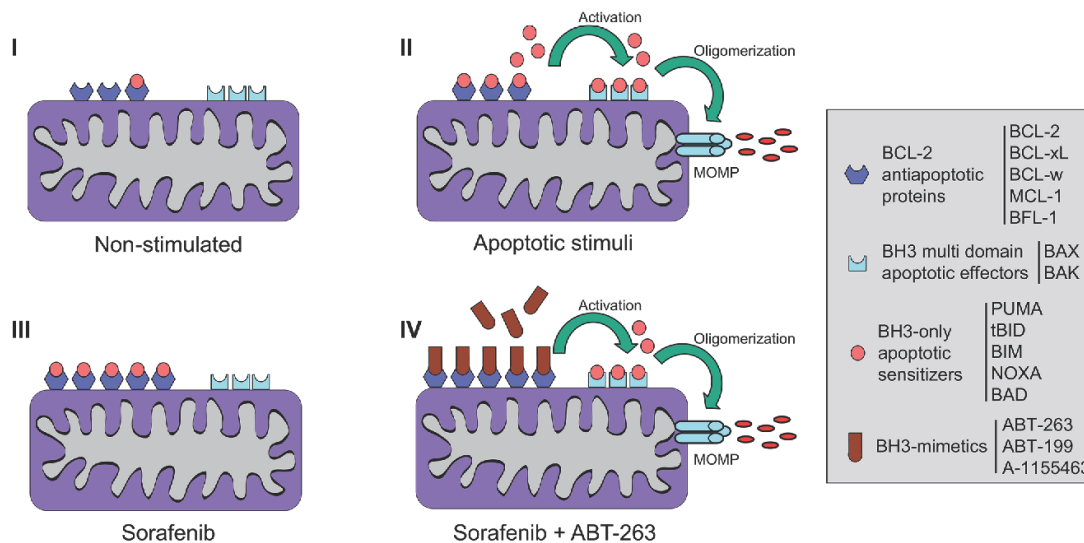


Figure 9: Scheme representing the mitochondrial effects induced by sorafenib and BH3-mimetics on hepatoma cells. (I) Non-stimulated cells present expression of different BCL-2 family members. (II) After exposure to apoptotic stimuli that induce mitochondrial-dependent cell death, BH3-only apoptotic sensitizers, such as BIM or BID, if not sequestered by BCL-2 anti-apoptotic molecules, it will bind to and activate effector molecules BAX or BAK. This process leads to BAX/BAK oligomerization, mitochondrial membrane permeabilization, and the mitochondrial release of apoptogenic proteins such as cytochrome c. (III) Specific stimuli, like sorafenib, alter the levels of anti-apoptotic BCL-2 proteins avoiding cell death, but mito-priming the surviving cells to BH3-mimetics. (IV) In hepatoma cells after sorafenib exposure, ABT-263 sequesters anti-apoptotic BCL-2 and BCL-xL releasing BH3-only proteins such as BIM to bind BAX/BAK and trigger cell death.

(Figure 2A and Supplementary Figure 3). Although BCL-2/MCL-1 ratio could be an indicative marker of sorafenib activity, simultaneous BCL-xL inhibition seems to be required to potentiate sorafenib action. In agreement, navitoclax (ABT-263) is much more interesting, although the appearance of thrombocytopenia in patients has limited its development, particularly in hematologic malignancies [38]. In fact, an on-going clinical trial is testing the combination of navitoclax and sorafenib in HCC patients (NCT02143401), which would benefit from biomarkers for patient selection and follow up, such as the one we proposed.

Moreover, other BH3 mimetics could potentiate sorafenib effects. The lack of ABT-199 efficacy in combination with sorafenib, may suggest that HCC behaves as a BCL-xL-dependent tumor. So, BCL-xL inhibitors such as A-1155463 or A-133185 could deserve to be tested [35, 38, 39] in HCC treatment, despite not improving navitoclax effect in our models. As observed in patients, specific individuals exhibited remarkable differential expression of BCL-2 and BCL-xL that may justify different strategies in their treatments. Despite their similarities, BCL-2 and BCL-xL do not interact with the same proteins [39]. Both proteins are sensitized by increased BIM levels, as detected after sorafenib administration [42], but bind BAX and BAK differently. While all anti-apoptotic BCL-2 proteins bind BAX, only MCL-1 and BCL-xL bind BAK [43]. Coadministration of sorafenib and ABT-263 could unleash BAK from MCL-1 and BCL-xL respectively [44], and sequester BCL-2 from BAX, triggering simultaneously BAK activation and BAX translocation. Further studies could be necessary to assess this point, since complex interactions, and not simply expression patterns of BCL-2 proteins [45], may need to be investigated to optimize BH3-mimetics use and understand BCL-2 dependence. For instance, ABT-263 not also binds BCL-2 and BCL-xL but also increases the protein and mRNA levels of other BCL-2 proteins such as MCL-1 [46], besides activating ERK and AKT. Precisely through this kinase activity, navitoclax may also have an induction role in BCL-2 [47] and BCL-xL [48] expression. These effects exerted by ABT-263, and probably by other BH3-mimetics, should also be kept in mind. Furthermore, both navitoclax and the A-133185 BCL-xL inhibitor induce apoptotic death in PDGF-activated hepatic fibroblast and *in vivo* reduce liver fibrosis in the MDR2^{-/-} mouse model [49], supporting a link between BH3-induced apoptosis and liver fibrogenesis [50]. It is tempting to speculate that these features may become a second benefit in liver cancer patients with underlying chronic liver disease.

Finally, clinical practice associates a better outcome in sorafenib therapy to the development of adverse events such as hand-foot-skin reaction. Chemotherapy frequently induces inflammasome components that contribute to the body pro-inflammatory response [51,

52]. In particular, a relationship between dermatologic adverse events and complete response under sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma has been recently established [53]. Probably related to this, sorafenib causes mitochondrial ROS production and a severe decline in mitochondrial membrane potential. Relevantly, recent reports associate inflammasome activation to mitochondrial injury [52–54] and inflammasome restriction to removal of damaged mitochondria [55]. Regarding this point, our data may not be sufficient to assess this complicated network, e.g. different inflammasomes, canonical vs. non-canonical activation. Yet, navitoclax effect on inflammasome induction and side-effects in patients are aspects that deserve further analysis.

In conclusion, the BCL-2 profile determines sorafenib/regorafenib response and could help to early stratify patients before and under treatment. Meanwhile, navitoclax in particular, and BH3-mimetics in general, reveal as an interesting sorafenib combination to overcome sorafenib resistance without additional inflammatory response.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin and dimethyl sulfoxide (DMSO), MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (M2128), Hoechst 33258 (B1155), Crystal Violet (C0755), and DCF (D6883) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). All tissue culture-ware was from Nunc (Roskilde, Denmark). Biotin Blocking System, peroxidase substrate (DAB) and peroxidase buffer were from DAKO (Glostrup, Denmark). Aquatex was from Merck (Darmstadt, Germany). The ABC kit was from Vectastain (Burlingame, CA). Proteinase inhibitors were from Roche (Madrid, Spain). ECL western blotting substrate was from Pierce (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL). BCL-2 siRNA (h) (sc-29214), BCL-xL siRNA (h) (sc-43630), MCL-1 siRNA (h) (sc-35877) and scrambled controls were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX). Lipofectamine2000 (11668-027), Novex Sharp Pre-stained Protein Standard (LC5800) and JC-1 (T-3168) were from Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Sorafenib (BAY 43-9006, Nexavar) and Regorafenib (BAY 73-4506, Stivarga) are manufactured by Bayer. A-1155463, ABT-737, AT101, HA-14, ABT-263 (Navitoclax) and ABT-199 (Venetoclax) were purchased from Selleckchem (Houston, TX).

Cell culture and biochemical analysis

Human liver tumor cell lines Hep3B, PLC and HepG2 (European Collection of Animal Cell Cultures

(ECACC) were grown in DMEM (10% FBS) at 37°C and 5% CO₂. Sorafenib-resistant hepatoma cells [11], were maintained at 2.5 μM sorafenib and kept without drug at least one week before experiments. Cell viability measured by MTT assay and clonogenic assays by Crystal Violet Staining, Hoechst staining, and caspase-3 activity were analyzed as previously indicated [11, 56].

Immunoblot analysis

Cell lysates were prepared in RIPA buffer plus proteinase inhibitors. Samples containing 10 to 30 μg were separated by 10-15% SDS-PAGE. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes, blocked in 5% nonfat milk for 1h at room temperature, and incubated overnight at 4°C with the primary antibodies:

MCL-1 (S-19) (SantaCruz, sc-819) 1:250 rabbit
 BCL-2 (C-2) (SantaCruz, sc-7382) 1:250 mouse
 BCL-xL (H-5) (SantaCruz, sc-8392) 1:250 mouse
 PARP-1 (H-250) (SantaCruz, sc-7150) 1:250 rabbit
 BIM (H-191) (SantaCruz, sc-11425) 1:250 rabbit
 Phospho-BIM (Ser69) (Cell Signaling, #4581) 1:1000 rabbit
 Cytochrome C (SantaCruz, sc-1356) 1:250 mouse
 β-Actin (Sigma-Aldrich, A3854) 1:40,000 conjugated to HRP

RNA isolation and real time RT-PCR

Total RNA was isolated with TRIzol reagent. 1 μg of RNA was reverse-transcribed with iScript™ cDNA Synthesis Kit (Biorad, Berkeley, CA) and real-time PCR was performed with iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Biorad, Berkeley, CA) following the manufacturer's instructions [11, 56]. The primers sequences used were:

human BCL-2: Fw 5'-GGAGGATTGTGGCCTTCTTT-3'
 Rv 5'-GCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'
 human BCL-xL: Fw 5'-GGATGGCCACTTACCTGA-3'
 Rv 5'-CGGTTGAAGCGTTCCTG-3'
 human MCL-1: Fw 5'-ATGCTTCGAAACTGGACAT-3'
 Rv 5'-TCCTGATGCCACCTTCTAGG-3'
 human BCL-B: Fw 5'-GCTGGGATGGCTTTTGTC-3'
 Rv 5'-GCCTGGACCAGCTGTTTTCTC-3'
 human BCL-w: Fw 5'-ACCCAGGCTCAGCCCAACA-3'
 Rv 5'-CAGCACACAGTGCAGCCCCA-3'
 human BFL-1: Fw 5'-TTACAGGCTGGCTCAGGACT-3'
 Rv 5'-AGCACTCTGGACGTTTTGCT-3'
 human BIM: Fw 5'-TGGCAAAGCAACCTTCTGATG-3'
 Rv 5'-GCAGGCTGCAATTGTCTACCT-3'
 human NOXA: Fw 5'-TGGAAAGTCGAGTGTGCTACTCA-3'
 Rv 5'-CAGAAGAGTTTGGATATCAGATT-3'
 human PUMA: Fw 5'-GCATGCCTGCCTCACCTT-3'
 Rv 5'-TCACACGTCGCTCTCTCTAAACC-3'
 human β-Actin: Fw 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3'
 Rv 5'-AGAGGCGTACAGGGATAGCA-3'

human 18S: Fw 5'-CCGAAGATATGCTCATGTGG-3'
 Rv 5'-TCTTGTACTGGCGTGGATTG-3'

Immunohistochemical staining

Liver and tumor samples were fixed and 5-μm sections were prepared following standard procedures. The slices were examined with a Zeiss Axioplan microscope equipped with a Nikon DXM1200F digital camera. Apoptotic cells with fragmented nuclei were detected in paraffin samples using TUNEL labeling containing fluorescein-dUTP and -dNTPs (TUNEL Label Mix, Roche). TUNEL positive cells were observed and quantified using a NIKON Eclipse E-100 microscope.

Tumor animal models

All animal procedures were performed according to protocols approved by the Animal Experimentation Ethics Committee from the University of Barcelona. For subcutaneous tumor model, male Swiss nude mice, 5-6 week old, were kept under pathogen-free conditions with free access to standard food and water. HepG2 cells (5×10⁶) or BCLC9 cells (2.5×10⁶) were injected subcutaneously into the flanks of mice in 100 μL DMEM without FBS, as previously reported [11, 57]. Treatments with ABT-263 (100 mg/Kg body weight), sorafenib (80 mg/Kg) or vehicle (12.5% Cremophor, 12.5% ethanol, 75% sterile saline) were delivered daily via oral gavage for 21 days. Tumors were measured periodically with a Vernier caliper, and the volume was calculated as length × width² × 0.5.

Gene array

A predesigned 384-well human Liver cancer panel (SAB Target List, H384 Cat#10034526) for SYBR Green detection (Bio-rad) was used following the manufacturer's instructions, as previously reported [56].

HCC patient study

Samples, tumor and non-tumor biopsies, from twelve patients diagnosed with HCC and treated at the Clinic Hospital in Barcelona, and ten healthy liver samples from patients subjected to surgery due to colorectal cancer without any diagnosed liver disease, were included. Patients gave informed consent in according to the principles embodied in the Declaration of Helsinki.

Statistical analyses

Results are expressed as mean ± standard deviation and n=3, unless indicated. Statistical comparisons were usually performed using unpaired 2-tailed Student's *t* test, and 1-way ANOVA followed by Newman-Keuls Multiple Comparison Test (GraphPad Prism) was used for data

quantification from patients. A *P* value less than 0.05 was considered significant.

CONFLICTS OF INTEREST

Dr. Bruix consults for, advises for, and received grants from Bayer. He consults for and advises for Biocompatibles, Novartis, Daiichi, Arqule, Abbott, Bristol-Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Kowa, Lilly, Sirtex and Roche. Dr. Reig consults for Bayer. The other authors declare no competing interests.

FINANCIAL SUPPORT

Study funded by grants from Instituto de Salud Carlos III (FIS PI15/00145 to M.R., FIS PI14/00962 to J.B., PI13/00374 and PI16/00930 to M.M., CIBEREHD and CIBERNED), Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2015-69944-R to J.F.C., SAF2015-66515-R to A.M. and P.G.F., and SAF2013-47246-R to A.C.) and co-funded by FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional, Unión Europea); center grant P50-AA-11999 from Research Center for Liver and Pancreatic Diseases, US NIAAA to J.F.C.). Fundació Marató de TV3 (to A.C.), AGAUR (2014_SGR_605 to J.B. and 2014_SGR_785 to J.F.C.) and CERCA Programme / Generalitat de Catalunya.

REFERENCES

- Bruix J, Reig M, Sherman M. Evidence-based diagnosis, staging, and treatment of patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2016; 150:835–53. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.12.041>.
- Michelotti GA, Machado MV, Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2013; 10:656–65. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.183>.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 2008; 359:378–90. <http://doi.org/10.1056/nejmoa0708857>.
- Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017; 389:56–66. [http://doi.org/10.1016/s0140-6736\(16\)32453-9](http://doi.org/10.1016/s0140-6736(16)32453-9).
- Wörms MA, Galle PR. HCC therapies—lessons learned. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2014; 11:447–52. <http://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.10>.
- Galmiche A, Chauffert B, Barbare JC. New biological perspectives for the improvement of the efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett*. 2014; 346:159–62. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.12.028>.
- Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; 11:621–32. <http://doi.org/10.1038/nrm2952>.
- Bhola Patrick D, Letai A. Mitochondria—judges and executioners of cell death sentences. *Mol Cell*. 2016; 61:695–704. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.019>.
- Lo SJ, Fan LC, Tsai YF, Lin KY, Huang HL, Wang TH, Liu H, Chen TC, Huang SF, Chang CJ, Lin Y Jr, Yung BY, Hsieh SY. A novel interaction of nucleophosmin with BCL2-associated X protein regulating death evasion and drug sensitivity in human hepatoma cells. *Hepatology*. 2013; 57:1893–905. <http://doi.org/10.1002/hep.26209>.
- Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM, Lledó JL, Caja L, Campbell JS, Fausto N, Fabregat I. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol*. 2012; 227:1319–25. <http://doi.org/10.1002/jcp.22843>.
- Stefanovic M, Tutusaus A, Martinez-Nieto GA, Barcena C, de Gregorio E, Moutinho C, Barbero-Camps E, Villanueva A, Colell A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC, Morales A. Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7:8253–67. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.6982>.
- Galmiche A, Ezzoukry Z, Francois C, Louandre C, Sabbagh C, Nguyen-Khac E, Descamps V, Trouillet N, Godin C, Regimbeau JM, Joly JP, Barbare JC, Duverlie G, et al. BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer Res*. 2010; 8:1116–25. <http://doi.org/10.1158/1541-7786.mcr-10-0029>.
- Ng KP, Hillmer AM, Chuah CT, Juan WC, Ko TK, Teo AS, Ariyaratne PN, Takahashi N, Sawada K, Fei Y, Soh S, Lee WH, Huang JW, et al. A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med*. 2012; 18:521–8. <http://doi.org/10.1038/nm.2713>.
- Chiou JF, Tai CJ, Wang YH, Liu TZ, Jen YM, Shiao CY. Sorafenib induces preferential apoptotic killing of a drug- and radio-resistant hep G2 cells through a mitochondria-dependent oxidative stress mechanism. *Cancer Biol Ther*. 2009; 8:1904–13. <http://doi.org/10.4161/cbt.8.20.9436>.
- Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*. 2001; 34:55–61. <http://doi.org/10.1053/jhep.2001.25387>.
- Hikita H, Takehara T, Shimizu S, Kodama T, Shigekawa M, Iwase K, Hosui A, Miyagi T, Tatsumi T, Ishida H, Li W, Kanto T, Hiramatsu N, et al. The Bcl-xL inhibitor, ABT-737, efficiently induces apoptosis and suppresses growth of hepatoma cells in combination with sorafenib. *Hepatology*. 2010; 52:1310–21. <http://doi.org/10.1002/hep.23836>.

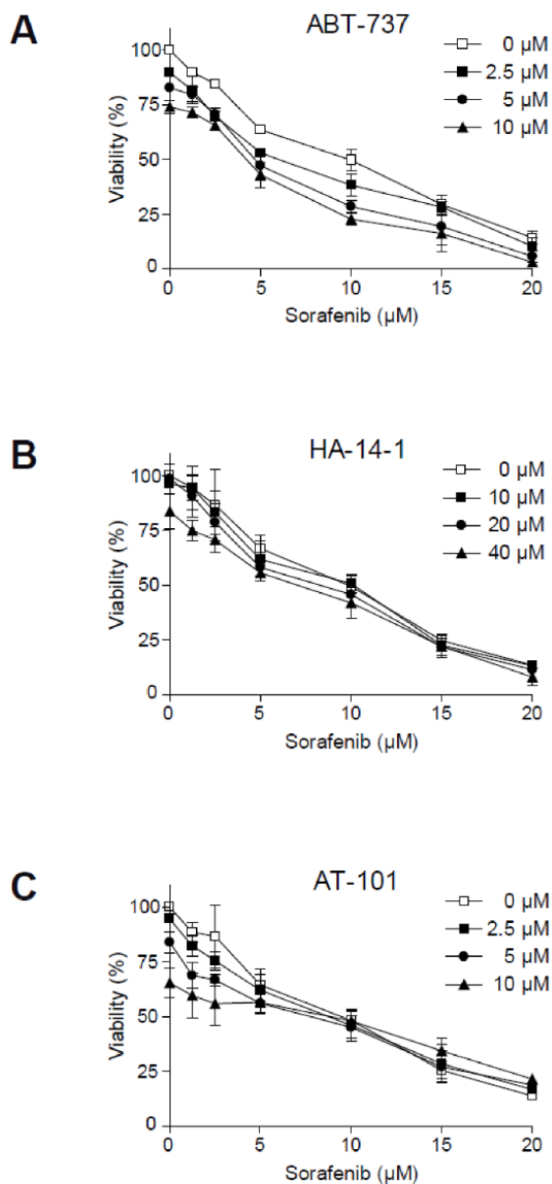
17. Rahmani M, Aust MM, Attkisson E, Williams DC, Ferreira-Gonzalez A, Grant S. Inhibition of Bcl-2 antiapoptotic members by obatoclax potentially enhances sorafenib-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a Bim-dependent process. *Blood*. 2012; 119:6089–98. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-09-378141>.
18. Punnoose EA, Levenson JD, Peale F, Boghaert ER, Belmont LD, Tan N, Young A, Mitten M, Ingalla E, Darbonne WC, Oleksijew A, Tapang P, Yue P, et al. Expression profile of BCL-2, BCL-XL, and MCL-1 predicts pharmacological response to the BCL-2 selective antagonist venetoclax in multiple myeloma models. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15:1132–44. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-15-0730>.
19. Al-harbi S, Hill BT, Mazumder S, Singh K, DeVecchio J, Choudhary G, Rybicki LA, Kalaycio M, Maciejewski JP, Houghton JA, Almasan A. An antiapoptotic BCL-2 family expression index predicts the response of chronic lymphocytic leukemia to ABT-737. *Blood*. 2011; 118:3579–90. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340364>.
20. Touzeau C, Ryan J, Guerriero J, Moreau P, Chonghaile TN, Le Guillou S, Richardson P, Anderson K, Amiot M, Letai A. BH3 profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in multiple myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia*. 2015; 30:761–4. <http://doi.org/10.1038/leu.2015.184>.
21. Montero J, Sarosiek Kristopher A, DeAngelo Joseph D, Maertens O, Ryan J, Ercan D, Piao H, Horowitz Neil S, Berkowitz Ross S, Matulonis U, Jänne Pasi A, Amrein Philip C, Cichowski K, et al. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell*. 2015; 160:977–89. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.01.042>.
22. Lindner AU, Salvucci M, Morgan C, Monsefi N, Resler AJ, Cremona M, Curry S, Toomey S, O'Byrne R, Bacon O, Stühler M, Flanagan L, Wilson R, et al. BCL-2 system analysis identifies high-risk colorectal cancer patients. *Gut*. 2017; 66:2141–2148. <http://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312287>.
23. Lopez J, Bessou M, Riley JS, Giampazolias E, Todt F, Rohegüe T, Oberst A, Green DR, Edlich F, Ichim G, Tait SW. Mito-priming as a method to engineer Bcl-2 addiction. *Nature Communications*. 2016; 7:10538. <http://doi.org/10.1038/ncomms10538>.
24. Levenson JD, Phillips DC, Mitten MJ, Boghaert ER, Diaz D, Tahir SK, Belmont LD, Nimmer P, Xiao Y, Ma XM, Lowes KN, Kovar P, Chen J, et al. Exploiting selective BCL-2 family inhibitors to dissect cell survival dependencies and define improved strategies for cancer therapy. *Sci Transl Med*. 2015; 7:279ra40. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa4642>.
25. Certo M, Del Gaizo Moore V, Nishino M, Wei G, Korsmeyer S, Armstrong SA, Letai A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell*. 2006; 9:351–65. <http://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.027>.
26. Li J, Chen Y, Wan J, Liu X, Yu C, Li W. ABT-263 enhances sorafenib-induced apoptosis associated with Akt activity and the expression of Bax and p21((CIP1/WAF1)) in human cancer cells. *Br J Pharmacol*. 2014; 171:3182–95. <http://doi.org/10.1111/bph.12659>.
27. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, Fitzgerald P, Guio-Carrion A, Waterhouse NJ, Li CW, Mari B, Barbry P, Newmeyer DD, et al. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*. 2007; 129:983–97. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.045>.
28. Boix L, López-Oliva JM, Carolina Rhodes A, Bruix J. Restoring mir122 in human stem-like hepatocarcinoma cells, prompts tumor dormancy through smad-independent TGF-β pathway. *Oncotarget*. 2014; 7:71309–71329. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.11885>.
29. Tong J, Tan S, Zou F, Yu J, Zhang L. FBW7 mutations mediate resistance of colorectal cancer to targeted therapies by blocking Mcl-1 degradation. *Oncogene*. 2017; 36:787–96. <http://doi.org/10.1038/ncr.2016.247>.
30. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, Chen C, Zhang X, Vincent P, McHugh M, Cao Y, Shujath J, Gawlak S, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res*. 2004; 64:7099–109. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1443>.
31. El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, Choo SP, Trojan J, Welling THR, Meyer T, Kang YK, Yeo W, et al. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017; 389:2492–502. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31046-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31046-2).
32. Sia D, Jiao Y, Martinez-Quetglas I, Kuchuk O, Villacorta-Martin C, Castro de Moura M, Putra J, Camprecios G, Bassaganyas L, Akers N, Losic B, Waxman S, Thung SN, et al. Identification of an immune-specific class of hepatocellular carcinoma, based on molecular features. *Gastroenterology*. 2017; 153:812–826. <http://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.06.007>.
33. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, McKeegan E, Salem AH, Zhu M, Ricker JL, Blum W, DiNardo CD, Kadia T, et al. Efficacy and biological correlates of response in a phase II study of venetoclax monotherapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Cancer Discov*. 2016; 6:1106–17. <http://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-16-0313>.
34. Del Gaizo Moore V, Letai A. BH3 profiling – measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer Lett*. 2013; 332:202–5. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.12.021>.

35. Sherman M, Bruix J. Biopsy for liver cancer: how to balance research needs with evidence-based clinical practice. *Hepatology*. 2015; 61:433–6. <http://doi.org/10.1002/hep.27563>.
36. Sun X, Niu X, Chen R, He W, Chen D, Kang R, Tang D. Metallothionein-1G facilitates sorafenib resistance through inhibition of ferroptosis. *Hepatology*. 2016; 64:488–500. <http://doi.org/10.1002/hep.28574>.
37. Azzariti A, Mancarella S, Porcelli L, Quatralè AE, Caligiuri A, Lupo L, Dituri F, Giannelli G. Hepatic stellate cells induce hepatocellular carcinoma cell resistance to sorafenib through the laminin-332/ α 3 integrin axis recovery of focal adhesion kinase ubiquitination. *Hepatology*. 2016; 64:2103–17. <http://doi.org/10.1002/hep.28835>.
38. Gibson CJ, Davids MS. BCL-2 antagonism to target the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:5021–9. <http://doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-15-0364>.
39. Soderquist R, Eastman A. BCL2 inhibitors as anticancer drugs: a plethora of misleading BH3 mimetics. *Mol Cancer Ther*. 2016; 15:2011–7. <http://doi.org/10.1158/1535-7163.mct-16-0031>.
40. Green DR. A BH3 mimetic for killing cancer cells. *Cell*. 2016; 165:1560. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.080>.
41. Souers AJ, Levenson JD, Boghaert ER, Ackler SL, Catron ND, Chen J, Dayton BD, Ding H, Enschede SH, Fairbrother WJ, Huang DC, Hymowitz SG, Jin S, et al. ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nat Med*. 2013; 19:202–8. <http://doi.org/10.1038/nm.3048>.
42. Zhang W, Konopleva M, Ruvolo VR, McQueen T, Evans RL, Bornmann WG, McCubrey J, Cortes J, Andreeff M. Sorafenib induces apoptosis of AML cells via Bim-mediated activation of the intrinsic apoptotic pathway. *Leukemia*. 2008; 22:808–18. <http://doi.org/10.1038/sj.leu.2405098>.
43. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, Adams JM, Huang DC. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes Dev*. 2005; 19:1294–305. <http://doi.org/10.1101/gad.1304105>.
44. Chen S, Dai Y, Harada H, Dent P, Grant S. Mcl-1 down-regulation potentiates ABT-737 lethality by cooperatively inducing Bak activation and Bax translocation. *Cancer Res*. 2007; 67:782–91. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3964>.
45. Morales AA, Kurtoglu M, Matulis SM, Liu J, Siefker D, Gutman DM, Kaufman JL, Lee KP, Lonial S, Boise LH. Distribution of Bim determines Mcl-1 dependence or codependence with Bcl-xL/Bcl-2 in Mcl-1-expressing myeloma cells. *Blood*. 2011; 118:1329–39. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-327197>.
46. Wang B, Ni Z, Dai X, Qin L, Li X, Xu L, Lian J, He F. The Bcl-2/xL inhibitor ABT-263 increases the stability of Mcl-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2014; 13:98. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-13-98>.
47. Dimmeler S, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM. Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*. 1999; 189:1815–22. <http://doi.org/10.1084/jem.189.11.1815>.
48. Zhou W, Xu J, Gelston E, Wu X, Zou Z, Wang B, Zeng Y, Wang H, Liu A, Xu L, Liu Q. Inhibition of Bcl-xL overcomes polyploidy resistance and leads to apoptotic cell death in acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget*. 2015; 6:21557–71. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.4306>.
49. Moncsek A, Al-Suraih MS, Trusconi CE, O'Hara SP, Splinter PL, Zuber C, Patsenker E, Valli PV, Fingas CD, Weber A, Zhu Y, Tchkonja T, Kirkland JL, et al. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with Bcl-xL inhibitors ameliorates fibrosis in Mdr2^{-/-} mice. *Hepatology*. 2018; 67:247–259. <http://doi.org/10.1002/hep.29464>.
50. Eguchi A, De Mollerat Du Jeu X, Johnson CD, Nektaria A, Feldstein AE. Liver Bid suppression for treatment of fibrosis associated with non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol*. 2016; 64:699–707. <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.11.002>.
51. Zhong Z, Sanchez-Lopez E, Karin M. Autophagy, Inflammation, and immunity: a troika governing cancer and its treatment. *Cell*. 2016; 166:288–98. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.051>.
52. Guo H, Callaway JB, Ting JP. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat Med*. 2015; 21:677–87. <http://doi.org/10.1038/nm.3893>.
53. Rimola J, Diaz-González Á, Darnell A, Varela M, Pons F, Hernandez-Guerra M, Delgado M, Castroagudin J, Matilla A, Sangro B, Rodríguez de Lope C, Sala M, Gonzalez C, et al. Complete response under sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma: relationship with dermatologic adverse events. *Hepatology*. 2017. <http://doi.org/10.1002/hep.29515>. [Epub ahead of print].
54. Garcia-Martinez I, Santoro N, Chen Y, Hoque R, Ouyang X, Caprio S, Shlomchik MJ, Coffman RL, Candia A, Mehal WZ. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9. *J Clin Invest*. 2016; 126:859–64. <http://doi.org/10.1172/jci83885>.
55. Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali Syed R, McGeough Matthew D, Ellisman Mark H, Seki E, et al. NF- κ B restricts inflammasome activation via elimination of damaged mitochondria. *Cell*. 2016; 164:896–910. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.057>.
56. de Mingo Á, de Gregorio E, Moles A, Tarrats N, Tutusaus A, Colell A, Fernandez-Checa JC, Morales A, Mari M. Cysteine cathepsins control hepatic NF- κ B-dependent inflammation via sirtuin-1 regulation. *Cell Death and Disease*. 2016; 7:e2464. <http://doi.org/10.1038/cddis.2016.368>.

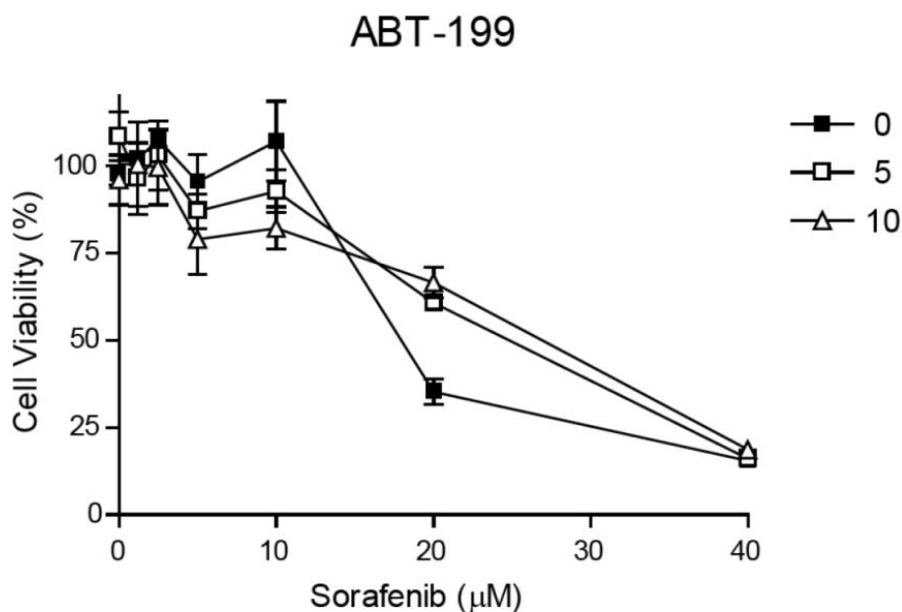
57. Morales A, Paris R, Villanueva A, Llacuna L, Garcia-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth *in vivo*. *Oncogene*. 2006; 26:905–16. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1209834>.

Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma

SUPPLEMENTARY MATERIALS



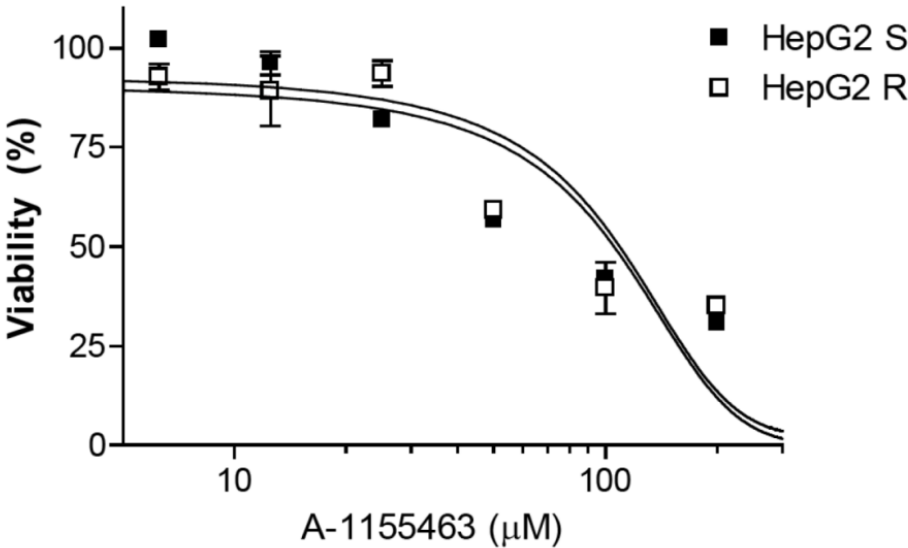
Supplementary Figure 1: Effect on sorafenib activity against hepatoma cells of different BH3 mimetics. MTT assays at different concentrations (μM) of compounds that interact with BCL-2 proteins, such as ABT-737 (A), HA-14-1 (B) and AT-101 (C), were tested in combination with sorafenib in Hep3B cells after 16 hours exposure ($n=3$).



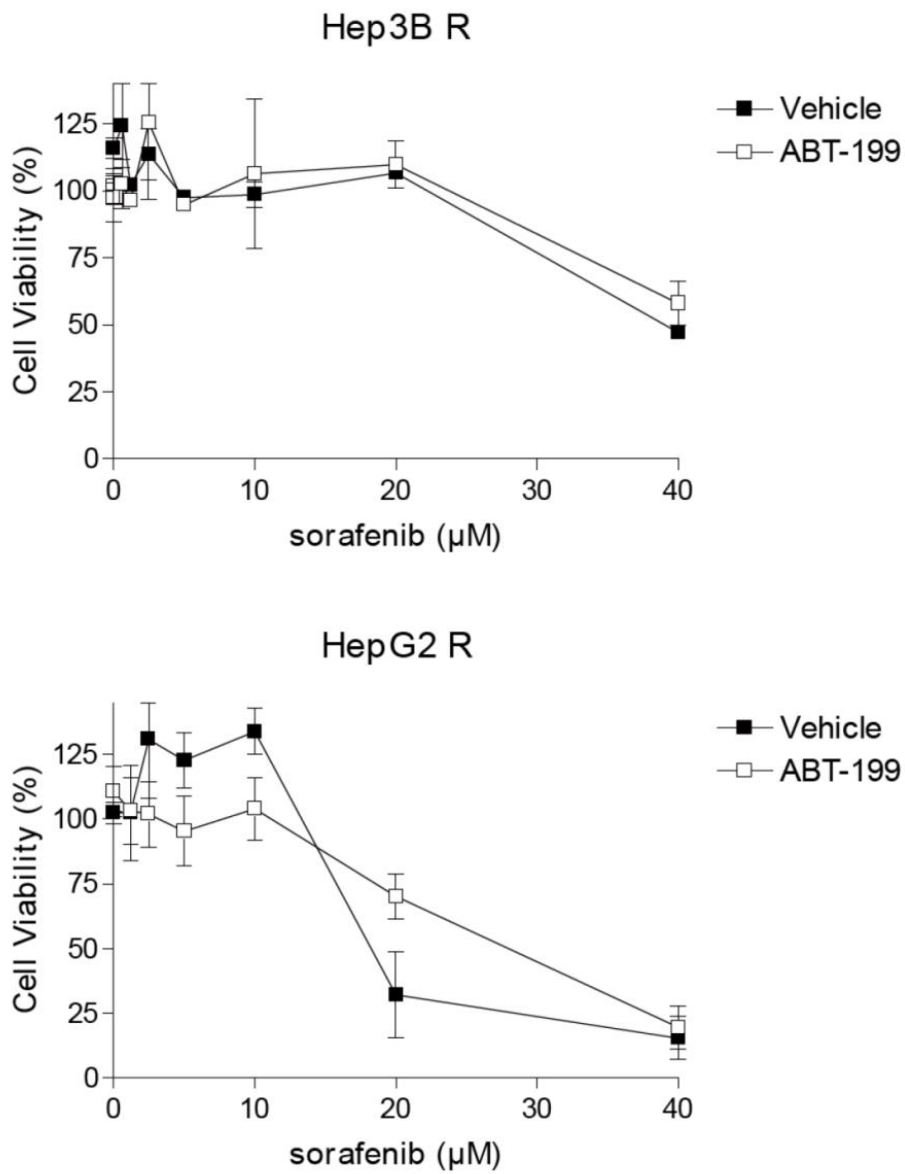
Supplementary Figure 2: BCL-2 inhibition alone (ABT-199) did not sensitize HepG2 cells against sorafenib. Cell viability after sorafenib administration in HepG2 cells treated with vehicle (0) or ABT-199 at 5 and 10 µM during 16 hours. (n=3).

GENDER	AGE	Underlying liver disease	ETHIOLOGY	Virus hepatitis	AFP (ngr/mL)	TUMOR SIZE (cm)	Tumor	Differentiation degree	Vascular Invasion
M	67	cirrhosis	alcohol	NO		4,5	single	NA	NA
M	61	cirrhosis	alcohol	NO	2	3,5	single + 1 satellite	well	No
M	47	cirrhosis	VHC	VHC	6	2,5	single		No
M	75	cirrhosis	VHC	VHC	23	1,1 (main tumor)	binodular	well	No
M	78	cirrhosis	VHC	VHC		4,5	single	well+moderate	No
M	73	cirrhosis	VHC	VHC	2	2,1	single	moderate	No
M	67	cirrhosis	VHC	VHC	22	2,1	single	well+moderate	No
M	54	cirrhosis	VHC+VHB+alcohol	VHC+VHB	15	1,3	single	well	NA
M	63	cirrhosis	VHC	VHC	2	2,2	single	well+moderate	No
M	64	cirrhosis	alcohol	NO	6	4,5	single	well	No
M	50	cirrhosis	VHC+alcohol	VHC	19	1,4	single	well	NA
F	61	cirrhosis	VHC	VHC	11	2,1	single	well	No
M	68	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
F	70	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
F	47	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
F	50	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
F	55	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
M	36	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
M	36	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
M	55	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
M	37	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA
F	73	healthy liver	NA	NO	NA	NA	NA	NA	NA

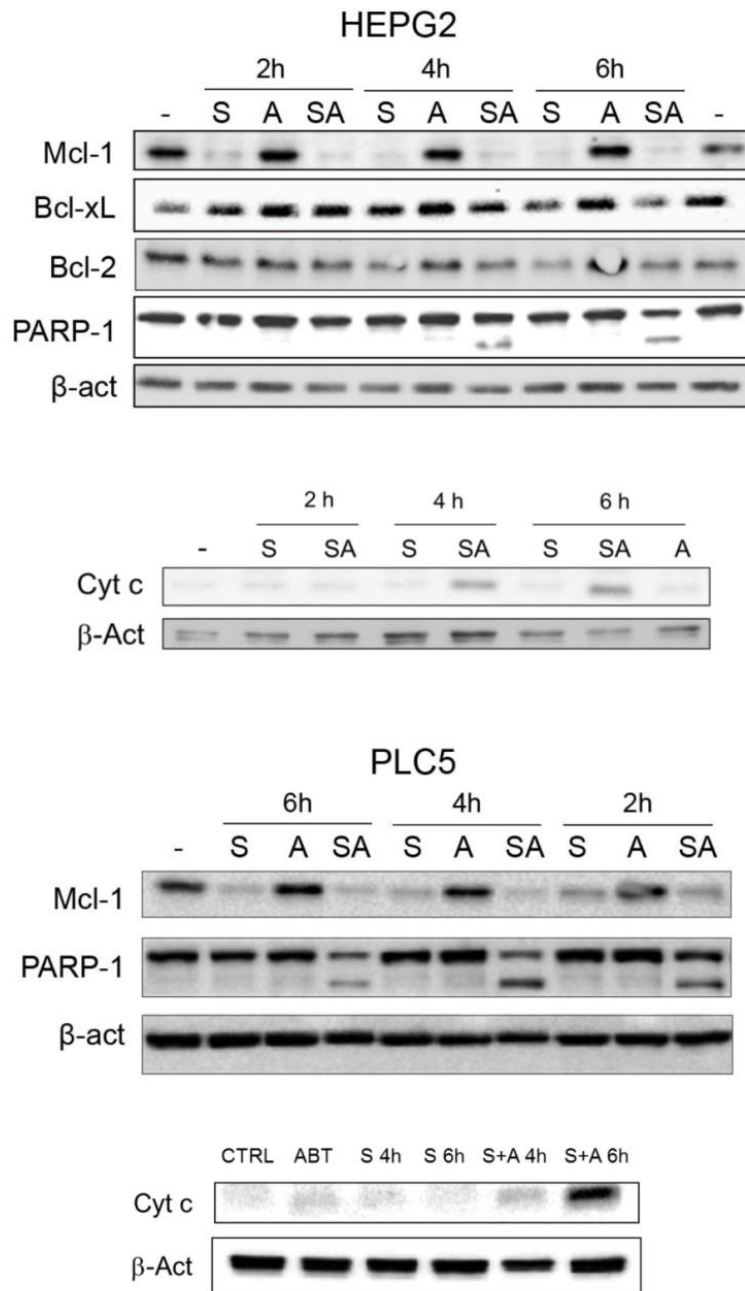
Supplementary Figure 3: Characteristics of patients included in the study.



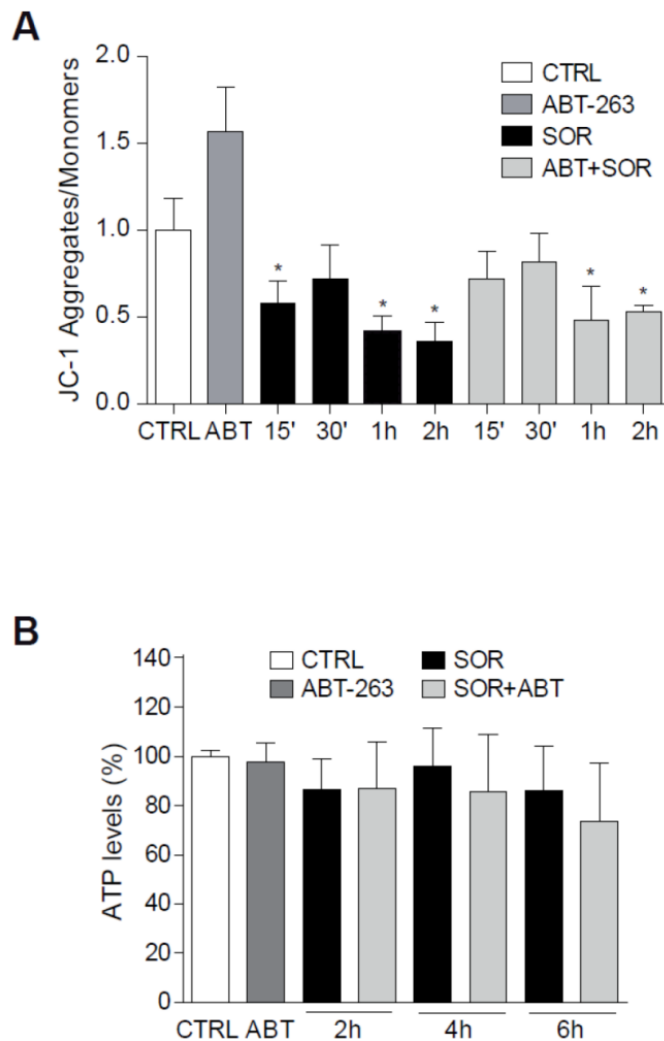
Supplementary Figure 4: Sorafenib-resistant HepG2 cells are not sensitized against BCL-xL inhibitor A-1155463. Cell viability after A-1155463 administration to sorafenib resistant (R) and sensitive (S) HepG2 cells during 16 hours. (n=3).



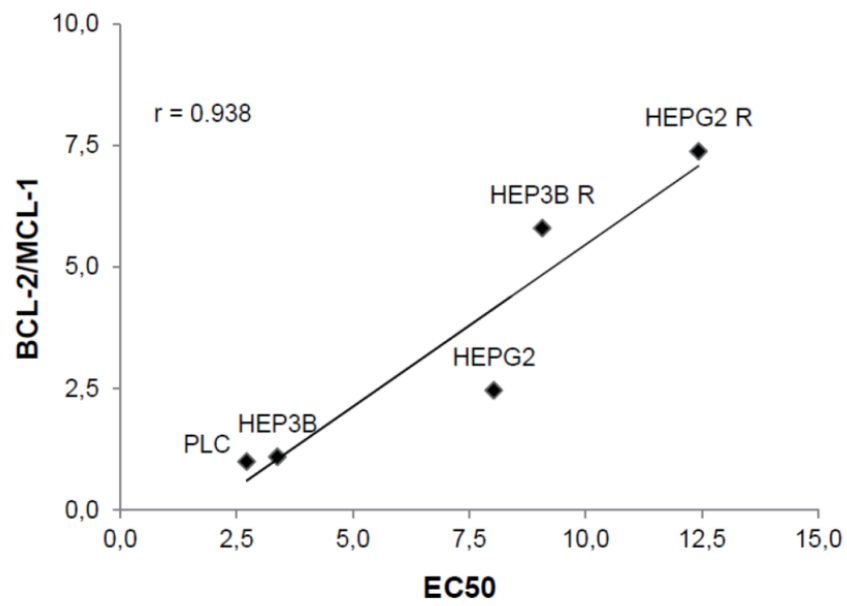
Supplementary Figure 5: BCL-2 inhibition alone (ABT-199) did not sensitize resistant hepatoma cells against sorafenib. Cell viability after sorafenib administration in HepG2 cells treated with vehicle or ABT-199 at 10 µM concentration during 16 hours. (n=3).



Supplementary Figure 6: ABT-263 induced mitochondrial dependent cell death in sorafenib-treated HepG2 and PLC5 cells. HepG2 and PLC5 cells were treated with sorafenib (S, 10 μ M), ABT-263 (A, 5 μ M) or the combination (SA) and analyzed at different times BCL-2 proteins, PARP-1 degradation and cytochrome c mitochondrial release (Cyt c), using β -actin as loading control.



Supplementary Figure 7: Effect of sorafenib and navitoclax on MMP and ATP levels. Hep3B cells were exposed to sorafenib (10 μ M) with or without ABT-263 (5 μ M). **(A)** Mitochondrial membrane potential by JC 1 determination and **(B)** ATP levels were measured. (n=3). *P < 0.05 vs. control Hep3B cells.



Supplementary Figure 8: Correlation between relative BCL-2/MCL-1 ratio and sorafenib cytotoxicity in hepatoma cell lines. mRNA levels of BCL-2 and MCL-1 were measured by qPCR and MTT assays were performed after 24 h of sorafenib exposure.

Discusión

Actualmente la terapia para EHNA se basa en controlar los desórdenes metabólicos y las posibles complicaciones cardiovasculares así como un cambio en el estilo de vida. Sin embargo, muchos pacientes con EHNA no logran o no mantienen un estilo de vida saludable y la enfermedad progresa. Pese a que el desarrollo de fibrosis está asociado a la mortalidad relacionada con la enfermedad hepática (41) no existe ninguna terapia antifibrótica aprobada aunque se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos con nuevos fármacos. Durante estos últimos años, se han realizado muchos esfuerzos para encontrar una terapia eficaz que reduzca el desarrollo de cirrosis, aunque los problemas para estratificar correctamente a los pacientes y determinar su progreso dificultan el análisis e interpretación de los ensayos clínicos.

En el desarrollo de la fibrosis, las CEH juegan un papel fundamental. Estas células reciben señales de distintas procedencias que inducen su activación induciendo un desequilibrio entre la degradación y la producción de matriz extracelular e iniciando los procesos fibrogénicos en hígado. Nuestro grupo ya estableció la importancia del eje Gas6/AXL en la activación de las CEH y modelos animales de fibrosis inducida por CCl₄ (167), por lo que nos interesamos en el papel de estas proteínas en el desarrollo de la EHNA y en el potencial terapéutico de la inhibición de AXL.

Nuestros datos muestran que la activación de AXL en las líneas celulares de CEH es capaz de activar estas células mediante la fosforilación de AKT aumentando la migración celular, la expresión de genes fibrogénicos como Col1A1 y la secreción de quimioquinas como MCP1. Además, la inhibición farmacológica de AXL con BGB324 reduce todas estas características de CEH activadas mostrando su potencial antifibrótico *in vitro*. En macrófagos inflamatorios, el tratamiento con BGB324 no varía la expresión de TNF- α pero si reduce la de MCP1. Por lo tanto, aunque el BGB324 no reduzca la capacidad de secretar citoquinas inflamatoria, puede reducir la inflamación *in vivo* indirectamente mediante una menor infiltración de células inflamatorias por la reducción de la secreción de MCP1 por parte de las CEH y macrófagos.

La elección de modelos animales resulta difícil en el estudio de la EHNA por la falta de consenso y los inconvenientes que presentan. En nuestro caso, nos interesaban modelos con una fibrosis significativa para analizar su progresión, por lo que priorizamos las características de la patología hepática por encima de las metabólicas como la resistencia a insulina. En un primer lugar, escogimos la dieta MCD, modelo clásico de esteatohepatitis, pero la pérdida de peso por la deficiencia de metionina representaba un grave problema para el bienestar de los animales. Por ello, utilizamos también la dieta HFD alta en grasas deficiente en colina y restringida en metionina que, lejos del modelo ideal, permite establecer una fibrosis considerable, sin comprometer el peso ni el estado físico de los animales (84), siendo un modelo adecuado para nuestros estudios.

En este modelo animal, el tratamiento oral con el inhibidor BGB324 consigue reducir de manera significativa la fibrosis debido al efecto de la inhibición de AXL en las células estrelladas cuya activación es menor como muestran las inmunohistoquímicas de α -SMA. Este inhibidor, mediante la disminución de la expresión de citoquinas y quimioquinas, también reduce la infiltración inflamatoria. Asimismo, la colocalización de AXL con α -SMA y con F4/80 en muestras hepáticas de pacientes cirróticos demuestra un papel de AXL en EHNA no sólo en la activación de las CEH sino también en la población de macrófagos.

La inhibición de AXL además es capaz de reducir la expresión de múltiples genes, inducidos por la dieta, relacionados con la síntesis y degradación de matriz extracelular, como colágeno (COL3A1, COL2A1) e integrinas (ITGB8, ITGA2); metaloproteinasas (MMP3, MMP2), inhibidores de metaloproteinasa (TIMP, TIMP2) y otras proteasas implicadas en fibrosis como la activador de plasminógeno tipo uroquinasa (Plau). Destaca también la reducción del gen de la lisil-oxidasa (LOX), enzima que contribuye a la estabilización del colágeno y

dificulta la reversión de la fibrosis (413), pues indica que el tratamiento del BGB324 retardaría la progresión a una cirrosis irreversible.

Por otro lado hemos descrito un aumento de expresión en hígado de ratones con EHNA de ADAM10, una metaloproteínasa implicada en distintos procesos como la fragmentación de la proteína precursora amiloidea y la escisión de AXL. La expresión de ADAM10 también se encuentra aumentada en muestras humanas de pacientes de enfermedades hepáticas crónicas y se ha asociado a la severidad de la fibrosis (414). En este estudio, se describe además una elevada expresión de esta proteína en CEH humanas aunque también se observa la expresión de TACE (ADAM17). ADAM10 fragmenta la quimiocina CX3CL1, que induce la migración de monocitos, células de Kupffer y células NK, pero también el receptor de HGF, c-met, regulando así la proliferación de células progenitoras del hígado. Por lo tanto, siendo las CEH las principales células que expresan AXL en el hígado, podemos proponer a ADAM10 como responsable de su escisión y de su aumento en suero en EHNA.

En los pacientes con EHNA, la detección de AXL soluble mostró un aumento que correlaciona con una fibrosis más severa. En un primer momento, el grupo de Mikulits describió el aumento de AXL únicamente en pacientes con CHC pero no en pacientes cirróticos. Sin embargo, nuestros resultados previos mostraban niveles elevados en pacientes fibróticos con hepatitis C y esteatohepatitis alcohólica (167). Tras un análisis con un mayor número de muestras, el grupo de Mikulits confirmó este aumento en suero en fibrosis y cirrosis (415, 416). Nuestros últimos resultados muestran además que AXL aumenta progresivamente con el desarrollo de la EHNA y por lo tanto podría representar un buen candidato para la detección no invasiva de distintos grados de fibrosis en estos pacientes.

A diferencia de lo observado en modelos de inflamación hepática aguda donde la ausencia de AXL es perjudicial (165), la deficiencia en AXL protege de la EHNA inducida por la dieta HFD aunque en menor grado que su inhibición farmacológica. Esta discordancia puede deberse a los niveles de GAS6 circulantes que se encuentran elevados tras el tratamiento con el inhibidor BGB324. Se ha demostrado que GAS6 ejerce propiedades hepatoprotectoras (163) aumentando la supervivencia de hepatocitos en casos de isquemia y reperfusión. Además GAS6 reduce la inflamación en macrófagos a través de MERTK (417). Por lo que su aumento en suero podría reducir el daño hepático inducido por la dieta y activar MERTK en macrófagos activando su función fagocítica y antiinflamatoria.

En el modelo HFD, la expresión hepática de MERTK también está aumentada, como ocurre en pacientes con EHNA (169). Este receptor se ha relacionado con la activación de las CEH y su inhibición reduce esta activación *in vitro* (169). Sin embargo, nuestros estudios con animales deficientes en MERTK muestran el desarrollo de una EHNA con fibrosis severa, un mayor daño hepático y una inflamación exacerbada. Estos resultados son coherentes con otros estudios que demuestran la necesidad de la presencia de macrófagos hepáticos MERTK positivos para la resolución del daño inducido por modelos hepáticos agudos como la intoxicación por paracetamol (162). De hecho, en el estudio citado anteriormente, MERTK correlaciona con el marcador de macrófagos CD68 en muestras de pacientes con EHNA, confirmando su función en los macrófagos hepáticos (170). Por eso, este receptor no puede considerarse una diana adecuada para el tratamiento del EHNA por su importancia en la resolución de la inflamación hepática. También serían poco recomendables los inhibidores duales de AXL y MERTK, desarrollados para cáncer, que podría enmascarar los beneficios de la inhibición de AXL en EHNA y otras enfermedades hepáticas crónicas. Por otro lado, una inhibición de estos receptores TAM dirigida únicamente a las CEH permitiría evitar los efectos adversos de la inhibición de MERTK en las células inflamatorias.

Cabe mencionar que la importancia de AXL en la fibrogénesis no se limita únicamente al hígado. Estudios recientes muestran que este receptor tiene un papel esencial en la activación de los fibroblastos pulmonares y su inhibición reduce la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina en modelos animales (418). Por lo tanto, la función profibrogénica de AXL no se restringe a las CEH y su activación podría ser relevante en otros órganos susceptibles a fibrosis.

Por último, AXL ha adquirido un papel importante en la carcinogénesis y el inhibidor BGB324 ha mostrado un potente efecto antitumoral en diferentes tipos de cáncer (419). Esta inhibición promueve la respuesta inmune antitumoral, por lo que su eficacia aumenta en combinación con inhibidores de PD1 como el nivolumab, que ha sido aprobado recientemente para el CHC avanzado. De hecho, el cabozantinib, que inhibe AXL entre otras quinasa, ha mostrado un aumento de la supervivencia de pacientes con CHC avanzado en ensayos de fase III (420). Por lo tanto, aunque el efecto del BGB324 no se ha probado en modelos de cáncer hepático, su uso en el tratamiento del EHNA podría beneficiar a los pacientes con predisposición a desarrollar de cáncer.

Por lo tanto, dada la eficacia del inhibidor BGB324 reduciendo la fibrogénesis y la inflamación en modelos de EHNA (Figura 12), la detección de AXL soluble en suero de pacientes con EHNA y su importancia en la activación de las CEH, este receptor se presenta como una buena diana terapéutica y un marcador sérico de fibrosis que podría mejorar el diagnóstico de la EHNA. Dada la implicación de AXL en EMT y carcinogénesis, queda pendiente analizar el papel que podría tener AXL durante el desarrollo de CHC en un contexto de EHNA.

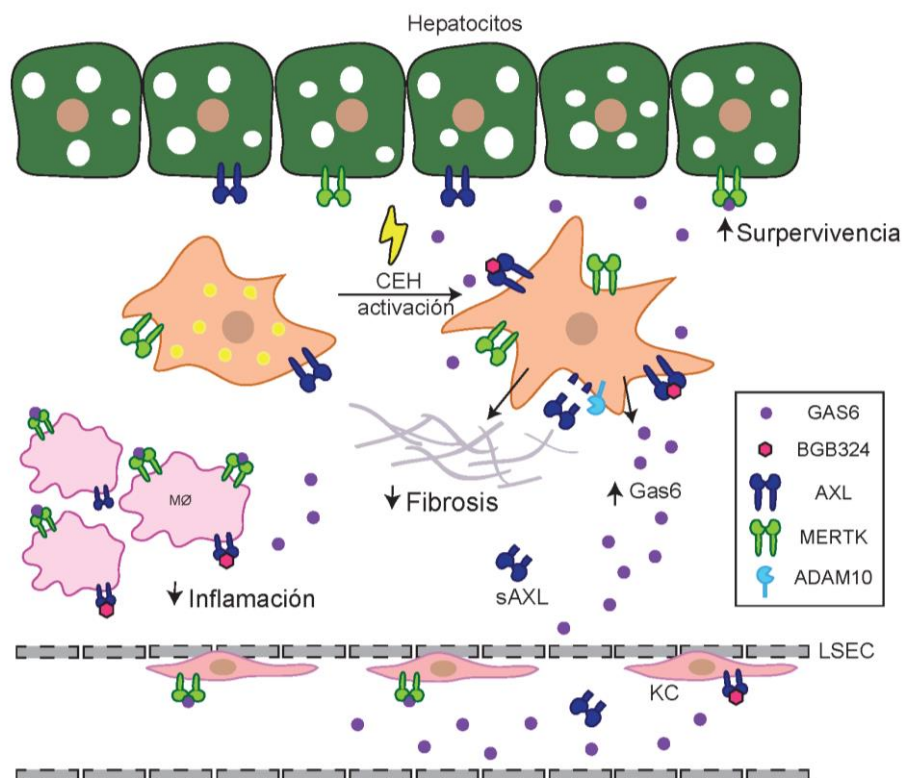


Figura 12: Resumen esquemático del efecto de la inhibición de AXL en EHNA.

BGB324 disminuye la activación de las células estrelladas (CEH) por lo que se genera menos matriz extracelular reduciendo la fibrosis. El aumento de GAS6 circulante por un lado, disminuye la secreción de citoquinas inflamatorias a través de MERTK en macrófagos (MØ) y células de Kupffer (KC), favoreciendo la resolución de la inflamación, y por otro lado promueve la supervivencia en los hepatocitos.

Respecto al carcinoma hepatocelular, su incidencia está en aumento y puede llegar al millón de casos anuales en los próximos años. La detección temprana de CHC ha mejorado gracias a los programas de vigilancia pero la mayoría de pacientes serán tratados con terapias sistémicas en estadios avanzados. Estas terapias sistémicas, como el sorafenib y recientemente el regorafenib, mejoran la supervivencia de los paciente prolongando la vida aproximadamente un año por lo que el CHC todavía es uno de los canceres con más mortalidad. Los análisis genómicos han permitido identificar las alteraciones moleculares más comunes en CHC, como las mutaciones de TERT o de la vía WNT, sin embargo la heterogeneidad molecular de estos tumores y el hecho que estas mutaciones habituales son intratables dificultan el tratamiento.

El sorafenib ha sido durante años el único tratamiento estándar pero su eficacia era limitada por problemas de tolerancia o la adquisición de resistencia. Los nuevos fármacos aprobados o a punto de aprobar por el éxito en ensayos clínicos abren una nueva ventana de posibilidades en el tratamiento de CHC avanzado y con ello la problemática de escoger el tratamiento más eficaz para cada paciente. Siguiendo esta línea, en este trabajo se ha pretendido identificar patrones de expresión relacionados con la resistencia y la susceptibilidad del sorafenib en CHC y al mismo tiempo definir dianas potencialmente tratables.

En el estudio de los esfingolípidos se demuestra que el sorafenib induce un aumento de la síntesis de ceramida vía SMasa, así como un incremento de la expresión y de la actividad de GCS en líneas celulares de hepatoma. Este aumento provoca la glicosilación de la ceramida, disminuyendo su efecto antiproliferativo y proapoptótico. Por ello, quisimos comprobar si la actividad de la GCS intervenía en el tratamiento con el sorafenib. Hemos demostrado que la inhibición del enzima mediante PDMP consigue mantener elevados los niveles de ceramida potenciando el efecto citotóxico del sorafenib en células de hepatoma. Estos resultados, muestran que el sorafenib, al igual que otros quimioterapéuticos, altera el metabolismo de los esfingolípidos evadiendo la muerte celular inducida por la ceramida.

El metabolismo de los esfingolípidos se ha relacionado ampliamente con la ineficacia de tratamientos antitumorales y, en concreto, la GCS se asocia a resistencia terapéutica en muchos tipos de cáncer como leucemias, melanoma o neuroblastoma (327). Nuestros resultados muestran que una mayor expresión de GCS en las células resistentes a sorafenib atenúa su efecto citotóxico. Por lo tanto, hemos demostrado que la actividad y la expresión de la GCS es mecanismo de resistencia a sorafenib en hepatocarcinoma. La expresión de la GCS podría identificar tumores con menor sensibilidad a sorafenib, sin embargo la obtención de muestras tumorales humanas en CHC avanzado no es fácil y la validación de la GCS como marcador de resistencia en tumores humanos tratados con sorafenib no se ha podido llevar a cabo.

El PDMP fue desarrollado como inhibidor reversible de la GCS por su similitud estructural con la glucosilceramida y ha servido como base para la identificación de nuevos inhibidores. Algunos de estos inhibidores han sido examinados en ensayos clínicos para enfermedades lisosomales. El eliglustat tartrato es uno de ellos y presenta una buena biodisponibilidad oral y poca toxicidad. Este inhibidor de GCS ha sido aprobado para el tratamiento de la enfermedad de Gaucher, caracterizada por la deficiencia de β -glucocerebrosidasa, que provoca una acumulación de glucosilceramida en los lisosomas sobre todo en hígado y bazo. El tratamiento con eliglustat disminuye la formación de glucosilceramida disminuyendo los síntomas de la enfermedad (421). Por lo tanto, este inhibidor, que ya se administra a pacientes sin efectos adversos graves, es un candidato para un posible tratamiento combinatorio en cáncer para favorecer el efecto citotóxico de las ceramidas y en concreto en CHC donde datos preliminares muestran un efecto potenciador del eliglustat combinado con el sorafenib.

Algunos estudios, sin embargo, apuntan a una menor importancia de la GCS en resistencia debido a que este enzima actúa más eficientemente sobre la ceramida producida mediante síntesis de novo que mediante hidrólisis

(422). Esto podría explicarse por la localización de este enzima en el aparato de Golgi. Nuestros datos indican que el sorafenib induce la producción de ceramidas a través de ASMas y son necesarios más estudios para determinar la función de la GCS respecto a la ceramida derivada de la esfingomielina así como sobre el transporte de estos esfingolípidos entre los orgánulos de la célula. Otra alternativa a la inhibición de GCS, es la administración de ceramidas mediante liposomas cuyo potencial terapéutico ya ha sido probado en modelos animales de CHC (423).

La mitocondria es un elemento clave en la toxicidad de las ceramidas. Un aumento de ceramida disminuye la actividad de la cadena respiratoria, produce la despolarización de la membrana mitocondrial y aumenta la producción de ROS (310). Las ceramidas de la membrana mitocondrial también pueden interactuar con autofagosomas que contienen LC3-II induciendo mitofagia (424). En las células de hepatoma, el sorafenib vía el aumento de ceramidas o mediante la inhibición de quinasas, induce una rápida despolarización de la membrana mitocondrial así como un aumento de ROS y la inactivación del complejo I de la cadena respiratoria; no obstante, las células mantienen la integridad de la mitocondria en tratamientos cortos. Como mecanismo de adaptación, las células tumorales son capaces de inducir autofagia y de desviar la obtención de ATP vía glicólisis (el llamado efecto Warburg) y además pueden sobrevivir con una pequeña fracción de mitocondrias intactas (281, 425). De hecho, estudios recientes indican que las células inducen la vía glicolítica para reducir el efecto citotóxico del sorafenib (426). Por lo tanto, según nuestros resultados, las células de hepatoma son capaces de contrarrestar el daño mitocondrial causado por el sorafenib pero no sobreviven tras el incremento mayor de ceramida producido por la inhibición de GCS. Pese a no ver diferencias en la actividad de GAPDH, enzima importante en la glucólisis, no podemos descartar que las ceramidas bloqueen la glicólisis como ocurre en LLC tras la administración ceramidas vía liposomas. Pero sí podemos concluir que estas ceramidas inducen una disfunción irreversible de la mitocondria caracterizada por la MOMP y una disminución de ATP que desencadenan un colapso energético y una muerte independiente de caspasa.

Otras publicaciones ya han relacionado las ceramidas con la pérdida de integridad de la mitocondria puesto que los dominios ricos en ceramida en la membrana mitocondrial facilitan la inserción de BAX/BAK y su oligomerización para formar poros (329, 427, 428). Por otro lado, las ceramidas también influyen en la función de proteínas antiapoptóticas. La defosforilación de BCL-2 por parte de la fosfatasa mitocondrial PP2A, diana de las ceramidas, aumenta el potencial antiapoptótico de esta proteína (429); y BCL-X_L es responsable de la supervivencia en células de adenocarcinoma pulmonar resistentes a vinorelbina tras el aumento de la actividad de GCS (430). Por lo tanto, en el caso del sorafenib, pese a la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y el aumento de ceramidas, proteínas antiapoptóticas podrían frenar esta inserción reduciendo su citotoxicidad y la inhibición de las mismas podría beneficiar en el tratamiento antitumoral del CHC.

Pese a la inhibición de la expresión de MCL-1 y el daño mitocondrial, las células de hepatoma tratadas con sorafenib evaden la MOMP y la muerte celular. Con la intención de potenciar el efecto mitocondrial del sorafenib, hemos descrito que la inhibición de BCL-2 y BCL-X_L mediante el mimético de BH3, ABT-263, induce apoptosis caspasa-dependiente a través de una rápida permeabilización de la membrana mitocondrial. La combinación de sorafenib y ABT-263 es efectiva en dos modelos de tumores subcutáneos donde se observa un menor crecimiento tumoral y mayor apoptosis. Hemos descrito alteraciones en la expresión de proteínas pro y antiapoptóticas de la familia Bcl-2 en células resistentes que podrían favorecer la evasión de la apoptosis y la generación de resistencia. La combinación de sorafenib con ABT-263 disminuye también la viabilidad de células resistentes a sorafenib confirmando la relevancia de las proteínas Bcl-2 en esta resistencia.

La importancia de la familia de proteínas Bcl-2 en la progresión de los tumores así como en la respuesta a terapia es indudable. La aparición de los miméticos de BH3 ha facilitado la terapia anticancerígena aprovechándose de la dependencia de estas proteínas, como el uso del ABT-199 en leucemias. De hecho, el concepto de *BH3 profiling* es una técnica desarrollada para determinar la inducción de MOMP mediante la exposición a péptidos BH3 identificando así las dependencias a proteínas antiapoptóticas en células tumorales. La evolución de este proceso, el DBP (*dynamic BH3 profiling*) ha surgido como una herramienta de medicina personalizada para predecir la respuesta a fármacos de muestras tumorales *ex vivo* basándose en la capacidad del fármaco de sensibilizar la célula a apoptosis (431). Nuestros resultados muestran que el sorafenib altera la expresión de genes de proteínas pro y antiapoptóticas y que la administración del mimético ABT-263 es capaz de sensibilizar células de hepatoma y tumores subcutáneos a sorafenib, exponiendo una nueva estrategia combinatoria para el tratamiento de CHC (Figura 13).

Uno de los inconvenientes del ABT-263 son sus efectos adversos, aunque pueden controlarse adecuando la dosis de administración. El principal efecto adverso es la trombocitopenia derivada de la importancia de BCL-X_L para la supervivencia de las plaquetas, así que decidimos analizar si otros miméticos potenciaban el efecto del sorafenib. Contrariamente, la inhibición específica de BCL-2 con ABT-199 no mostró ningún efecto sinérgico, mientras que el inhibidor específico de BCL-X_L, A-1155463, reproducía los resultados del navitoclax. Esto sugiere que el carcinoma hepatocelular es un tumor dependiente de BCL-X_L. Sin embargo BCL-2 está alterado en muchas de las muestras tumorales humanas analizadas, por lo que la inhibición de ambas podría ser conveniente para el tratamiento de CHC. BCL-X_L y BCL-2 no interactúan con las mismas proteínas proapoptóticas, lo que podría explicar esta dependencia. Mientras que BIM, cuyos niveles aumentan tras el tratamiento con sorafenib, interactúa con todas las proteínas antiapoptóticas; BAK sólo interactúa con BCL-X_L y MCL-1. La combinación de sorafenib y ABT-263, liberaría por completo a BAK y BAX favoreciendo su inserción en la membrana mitocondrial. Además, no hay que olvidar que se ha descrito la capacidad de BCL-X_L de desestabilizar los canales formados por ceramidas y por BAX en membranas mitocondriales (432).

Resulta interesante que la inhibición de BCL-X_L ejerza un papel antifibrótico en hígado. Un estudio reciente muestra la capacidad de los inhibidores A-1331852 y ABT-263 de inducir la muerte de fibroblastos activados mediante PDGF y reducir *in vivo* la fibrosis en el modelo transgénico deficiente en MDR2 (433). Puesto que una gran mayoría de CHC se desarrolla en hígados fibróticos y que los fibroblastos o CEH tienen un papel importante en la progresión tumoral, el tratamiento con ABT-263 y sorafenib podría beneficiar no solo induciendo muerte de las células tumorales sino también en las células del microambiente.

Por otro lado, estos últimos años, han crecido las evidencias médicas de un relación entre el principal efecto secundario del sorafenib, la reacción cutánea mano-pie, y una respuesta eficaz al tratamiento (434). Curiosamente, hemos observado que la administración de sorafenib *in vivo* induce la expresión de genes relacionados con la inflamación como TLR4 o PYCARD (componente del inflamasoma) en tumores subcutáneos. Estos resultados preliminares podrían indicar una relación entre el daño mitocondrial inducido por el sorafenib y la respuesta inflamatoria, en concreto la activación del inflamasoma. Son necesarios estudios más extensos para comprender el papel del sorafenib en inflamación y su relación con los efectos adversos cutáneos.

Mediante estudios de interacciones y análisis de expresión proteica o génica, se han establecido perfiles de expresión de la familia Bcl-2 en distintos tipos de tumores, que han permitido identificar dependencias de las células tumorales a alguno de los miembros de la familia y predecir la eficacia de las terapias (388, 435, 436). En nuestro estudio, hemos descrito alteraciones en la expresión génica de estas proteínas en tumores tratados con sorafenib y hemos observado una relación entre los niveles de BCL-2 y MCL-1 y la eficacia del tratamiento con

sorafenib. La aparición de nuevos fármacos para el CHC en los próximos años realza la necesidad de marcadores de sensibilización para facilitar la decisión médica. De corroborarse estos resultados en tumores humanos, el ratio BCL-2/MCL-1 podría emplearse en biopsias de tumores hepáticos para predecir la efectividad del sorafenib y poder administrar un tratamiento alternativo más eficaz. Actualmente, la biopsia de CHC durante el tratamiento no es una práctica habitual, sin embargo el análisis de biopsias pre y post sorafenib, permitiría confirmar estos perfiles de expresión y su uso como marcador de eficacia y de estratificación de los pacientes según la respuesta a sorafenib prevista. Estos resultados se basan en la expresión génica de estas proteínas, no obstante son necesarios más estudios para entender estas dependencias en CHC debido a las modificaciones postraduccionales que sufren estas proteínas y a las complejas interacciones entre ellas.

En resumen, estos resultados demuestran que el sorafenib, mediante el aumento de ceramidas, la inhibición de quinasas y la disminución de MCL-1 debilita la mitocondria induciendo la pérdida de potencial de membrana y la producción de ROS. En esta tesis se presentan dos estrategias terapéuticas, la inhibición de GCS y el uso de miméticos de BH3, que aprovechan esta disfuncionalidad para inducir la muerte de las células tumorales de manera independiente y dependiente de caspasa respectivamente. Además hemos confirmado el aumento de expresión de GCS como un marcador de resistencia a sorafenib en CHC y hemos propuesto el perfil de expresión de proteínas Bcl-2 como marcador de respuesta a sorafenib.

Conclusiones

1. La activación del receptor AXL es suficiente para inducir la activación de las células estrelladas hepáticas.
2. La inhibición de AXL reduce la fibrosis y la inflamación en modelos murinos de EHNA.
3. AXL soluble es un buen marcador sérico de fibrosis y su progresión en EHNA.
4. AXL está sobreexpresado en hígados de pacientes con EHNA y es expresado por macrófagos y CEH.
5. El sorafenib produce un aumento de ceramidas e incrementa la expresión de enzimas relacionados con el metabolismo de los esfingolípidos.
6. La inhibición de la GCS mediante el PDMP potencia el efecto antitumoral del sorafenib *in vitro* e *in vivo* induciendo una muerte independiente de caspasa.
7. GCS está sobreexpresada en células resistentes a sorafenib y su inhibición revierte esta resistencia.
8. El sorafenib produce una rápida despolarización de la membrana mitocondrial sensibilizando y debilitando la mitocondria.
9. El mimético de BH3 ABT-263 induce apoptosis en células sensibles o resistentes tratadas con sorafenib y su administración oral junto al sorafenib disminuye el crecimiento tumoral en modelos xenográficos.
10. El sorafenib altera la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 *in vivo* induciendo un aumento del ratio BCL-2/MCL-1 que podría predecir la efectividad del tratamiento.

Bibliografía

1. Grisham JW. Organizational Principles of the Liver: John Wiley & Sons, Ltd.; 2009. 1-15 p.
2. Adams DH, Eksteen B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nature Reviews Immunology*. 2006;6:244.
3. Kupffer C. Ueber Sternzellen der Leber. *Archiv für mikroskopische Anatomie*. 1876;12(1):353-8.
4. Friedman SL. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*. 2008;88(1):125-72.
5. Tsuchida T, Friedman SL. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(7):397-411.
6. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*. 2015;518(7540):547-51.
7. Krenkel O, Tacke F. Liver macrophages in tissue homeostasis and disease. *Nat Rev Immunol*. 2017;17(5):306-21.
8. Poisson J, Lemoine S, Boulanger C, Durand F, Moreau R, Valla D, et al. Liver sinusoidal endothelial cells: Physiology and role in liver diseases. *Journal of hepatology*. 2017;66(1):212-27.
9. M. YZ, B. KA, Dinan A, Yousef F, Linda H, Mark W. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease—Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2016;64(1):73-84.
10. Schuppan D, Schattenberg JM. Non-alcoholic steatohepatitis: pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2013;28 Suppl 1:68-76.
11. Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2008;40(12):1461-5.
12. Valenti L, Al-Serri A, Daly AK, Galmozzi E, Rametta R, Dongiovanni P, et al. Homozygosity for the patatin-like phospholipase-3/adiponutrin I148M polymorphism influences liver fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(4):1209-17.
13. Rotman Y, Koh C, Zmuda JM, Kleiner DE, Liang TJ. The association of genetic variability in patatin-like phospholipase domain-containing protein 3 (PNPLA3) with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;52(3):894-903.
14. Singal AG, Manjunath H, Yopp AC, Beg MS, Marrero JA, Gopal P, et al. The Effect of PNPLA3 on Fibrosis Progression and Development of Hepatocellular Carcinoma: A Meta-analysis. *The American Journal Of Gastroenterology*. 2014;109:325.
15. Liu YL, Patman GL, Leathart JBS, Piguat AC, Burt AD, Dufour JF, et al. Carriage of the *PNPLA3* rs738409 C >G polymorphism confers an increased risk of non-alcoholic fatty liver disease associated hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 2014;61(1):75-81.
16. Kozlitina J, Smagris E, Stender S, Nordestgaard BG, Zhou HH, Tybjaerg-Hansen A, et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature genetics*. 2014;46(4):352-6.
17. Dongiovanni P, Petta S, Maglio C, Fracanzani AL, Pipitone R, Mozzi E, et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2015;61(2):506-14.
18. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2007;45(6):1366-74.
19. Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2012;302(1):G77-84.
20. Nakamura S, Takamura T, Matsuzawa-Nagata N, Takayama H, Misu H, Noda H, et al. Palmitate induces insulin resistance in H4IIEC3 hepatocytes through reactive oxygen species produced by mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284(22):14809-18.
21. Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, et al. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2003;38(4):999-1007.

22. Arguello G, Balboa E, Arrese M, Zanlungo S. Recent insights on the role of cholesterol in non-alcoholic fatty liver disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2015;1852(9):1765-78.
23. Mari M, Caballero F, Colell A, Morales A, Caballeria J, Fernandez A, et al. Mitochondrial free cholesterol loading sensitizes to TNF- and Fas-mediated steatohepatitis. *Cell metabolism*. 2006;4(3):185-98.
24. Ioannou GN, Subramanian S, Chait A, Haigh WG, Yeh MM, Farrell GC, et al. Cholesterol crystallization within hepatocyte lipid droplets and its role in murine NASH. *Journal of lipid research*. 2017;58(6):1067-79.
25. Samuel VT, Shulman GI. Nonalcoholic Fatty Liver Disease as a Nexus of Metabolic and Hepatic Diseases. *Cell metabolism*. 2018;27(1):22-41.
26. Grancini V, Trombetta M, Lunati ME, Zimbalatti D, Boselli ML, Gatti S, et al. Contribution of beta-cell dysfunction and insulin resistance to cirrhosis-associated diabetes: Role of severity of liver disease. *Journal of hepatology*. 2015;63(6):1484-90.
27. Canello R, Tordjman J, Poitou C, Guilhem G, Bouillot JL, Hugol D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55(6):1554-61.
28. Stanton MC, Chen SC, Jackson JV, Rojas-Triana A, Kinsley D, Cui L, et al. Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *Journal of inflammation (London, England)*. 2011;8:8.
29. Schuster S, Cabrera D, Arrese M, Feldstein AE. Triggering and resolution of inflammation in NASH. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2018;15(6):349-64.
30. Adolph TE, Grander C, Moschen AR, Tilg H. Liver–Microbiome Axis in Health and Disease. *Trends in Immunology*. 2018.
31. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxaemia, and tumour necrosis factor α in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Gut*. 2001;48(2):206-11.
32. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(31):11070-5.
33. Moschen AR, Kaser S, Tilg H. Non-alcoholic steatohepatitis: a microbiota-driven disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2013;24(11):537-45.
34. Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M, Frantzides C, Harrell L, Kwasny MM, et al. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non-alcoholic steatohepatitis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2008;28(7):1026-33.
35. Csak T, Velayudham A, Hritz I, Petrasek J, Levin I, Lippai D, et al. Deficiency in myeloid differentiation factor-2 and toll-like receptor 4 expression attenuates nonalcoholic steatohepatitis and fibrosis in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(3):G433-41.
36. Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, Arrese M, Trauner M. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: Molecular insights and therapeutic perspectives. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2017;65(1):350-62.
37. Aranha MM, Cortez-Pinto H, Costa A, da Silva IBM, Camilo ME, de Moura MC, et al. Bile acid levels are increased in the liver of patients with steatohepatitis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2008;20(6):519-25.
38. Tanaka N, Matsubara T, Krausz KW, Patterson AD, Gonzalez FJ. Disruption of phospholipid and bile acid homeostasis in mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2012;56(1):118-29.
39. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. *Current opinion in gastroenterology*. 2014;30(3):332-8.
40. Schreuder TCMA, Marsman HA, Lenicsek M, Werven JRv, Nederveen AJ, Jansen PLM, et al. The hepatic response to FGF19 is impaired in patients with nonalcoholic fatty liver disease and insulin resistance. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2010;298(3):G440-G5.
41. S. DP, Siddharth S, Janki P, Meera S, J. PL, Zobair Y, et al. Increased risk of mortality by fibrosis stage in nonalcoholic fatty liver disease: Systematic review and meta-analysis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2017;65(5):1557-65.
42. Vilar-Gomez E, Calzadilla-Bertot L, Wai-Sun Wong V, Castellanos M, Aller-de la Fuente R, Metwally M, et al. Fibrosis Severity as a Determinant of Cause-Specific Mortality in Patients With Advanced Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2018.

43. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem.* 2000;275(4):2247-50.
44. Breitkopf K, Godoy P, Ciuclan L, Singer MV, Dooley S. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver. *Zeitschrift fur Gastroenterologie.* 2006;44(1):57-66.
45. Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *Journal of hepatology.* 1999;30(1):77-87.
46. Wong L, Yamasaki G, Johnson RJ, Friedman SL. Induction of beta-platelet-derived growth factor receptor in rat hepatic lipocytes during cellular activation in vivo and in culture. *The Journal of clinical investigation.* 1994;94(4):1563-9.
47. Pinzani M. PDGF and signal transduction in hepatic stellate cells. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library.* 2002;7:d1720-6.
48. Huang G, Brigstock DR. Regulation of hepatic stellate cells by connective tissue growth factor. *Frontiers in bioscience (Landmark edition).* 2012;17:2495-507.
49. Novo E, Marra F, Zamara E, Valfre di Bonzo L, Caligiuri A, Cannito S, et al. Dose dependent and divergent effects of superoxide anion on cell death, proliferation, and migration of activated human hepatic stellate cells. *Gut.* 2006;55(1):90-7.
50. Canbay A, Taimr P, Torok N, Higuchi H, Friedman S, Gores GJ. Apoptotic body engulfment by a human stellate cell line is profibrogenic. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2003;83(5):655-63.
51. Zhan SS, Jiang JX, Wu J, Halsted C, Friedman SL, Zern MA, et al. Phagocytosis of apoptotic bodies by hepatic stellate cells induces NADPH oxidase and is associated with liver fibrosis in vivo. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2006;43(3):435-43.
52. Wree A, Eguchi A, McGeough MD, Pena CA, Johnson CD, Canbay A, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2014;59(3):898-910.
53. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, et al. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. *Nature medicine.* 2007;13(11):1324-32.
54. Pradere JP, Kluwe J, De Minicis S, Jiao JJ, Gwak GY, Dapito DH, et al. Hepatic macrophages but not dendritic cells contribute to liver fibrosis by promoting the survival of activated hepatic stellate cells in mice. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2013;58(4):1461-73.
55. Henderson NC, Arnold TD, Katamura Y, Giacomini MM, Rodriguez JD, McCarty JH, et al. Targeting of alphav integrin identifies a core molecular pathway that regulates fibrosis in several organs. *Nature medicine.* 2013;19(12):1617-24.
56. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 2001;21(3):373-84.
57. Arthur MJ. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2000;279(2):G245-9.
58. Teratani T, Tomita K, Suzuki T, Oshikawa T, Yokoyama H, Shimamura K, et al. A high-cholesterol diet exacerbates liver fibrosis in mice via accumulation of free cholesterol in hepatic stellate cells. *Gastroenterology.* 2012;142(1):152-64.e10.
59. Chang TT, Liaw YF, Wu SS, Schiff E, Han KH, Lai CL, et al. Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2010;52(3):886-93.
60. Centis E, Marzocchi R, Di Domizio S, Ciaravella MF, Marchesini G. The effect of lifestyle changes in non-alcoholic fatty liver disease. *Digestive diseases (Basel, Switzerland).* 2010;28(1):267-73.
61. Oh Y, Park O, Swierczewska M, Hamilton JP, Park JS, Kim TH, et al. Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2016;64(1):209-23.
62. Krizhanovsky V, Yon M, Dickins RA, Hearn S, Simon J, Miething C, et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell.* 2008;134(4):657-67.
63. Kisseleva T, Cong M, Paik Y, Scholten D, Jiang C, Benner C, et al. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2012;109(24):9448-53.
64. Troeger JS, Mederacke I, Gwak GY, Dapito DH, Mu X, Hsu CC, et al. Deactivation of hepatic stellate cells during liver fibrosis resolution in mice. *Gastroenterology.* 2012;143(4):1073-83.e22.

65. Pappachan JM, Babu S, Krishnan B, Ravindran NC. Non-alcoholic Fatty Liver Disease: A Clinical Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2017;5(4):384-93.
66. Brunt EM, Wong VW, Nobili V, Day CP, Sookoian S, Maher JJ, et al. Nonalcoholic fatty liver disease. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15080.
67. Shah AG, Lydecker A, Murray K, Tetri BN, Contos MJ, Sanyal AJ. Comparison of noninvasive markers of fibrosis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009;7(10):1104-12.
68. Kittichai P, E. KD, M. NH, Elizabeth J, Marie K, R. WJ, et al. Randomized controlled trial testing the effects of weight loss on nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(1):121-9.
69. Makri E, Cholongitas E, Tziomalos K. Emerging role of obeticholic acid in the management of nonalcoholic fatty liver disease. *World journal of gastroenterology*. 2016;22(41):9039-43.
70. Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, et al. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Annals of hepatology*. 2013;12(2):256-62.
71. Honda H, Ikejima K, Hirose M, Yoshikawa M, Lang T, Enomoto N, et al. Leptin is required for fibrogenic responses induced by thioacetamide in the murine liver. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2002;36(1):12-21.
72. Yuichi Y, Satoru K, Daichi T, Takeshi I, Ken S, Hitoshi T, et al. Interstrain differences in susceptibility to non-alcoholic steatohepatitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008;23(2):276-82.
73. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2003;18(11):1272-82.
74. Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *The British journal of nutrition*. 2006;95(2):273-81.
75. Subramanian S, Goodspeed L, Wang S, Kim J, Zeng L, Ioannou GN, et al. Dietary cholesterol exacerbates hepatic steatosis and inflammation in obese LDL receptor-deficient mice. *Journal of lipid research*. 2011;52(9):1626-35.
76. Tetri LH, Basaranoglu M, Brunt EM, Yerian LM, Neuschwander-Tetri BA. Severe NAFLD with hepatic necroinflammatory changes in mice fed trans fats and a high-fructose corn syrup equivalent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2008;295(5):G987-G95.
77. Asgharpour A, Cazanave SC, Pacana T, Seneshaw M, Vincent R, Banini BA, et al. A diet-induced animal model of non-alcoholic fatty liver disease and hepatocellular cancer. *Journal of hepatology*. 2016;65(3):579-88.
78. Caballero F, Fernández A, Matías N, Martínez L, Fucho R, Elena M, et al. Specific Contribution of Methionine and Choline in Nutritional Nonalcoholic Steatohepatitis: IMPACT ON MITOCHONDRIAL S-ADENOSYL-L-METHIONINE AND GLUTATHIONE. *J Biol Chem*. 2010;285(24):18528-36.
79. Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, et al. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *Journal of lipid research*. 2006;47(10):2280-90.
80. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *Journal of hepatology*. 2004;40(1):47-51.
81. Veteläinen R, van Vliet A, van Gulik TM. Essential pathogenic and metabolic differences in steatosis induced by choline or methionine-choline deficient diets in a rat model. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(9):1526-33.
82. Nakae D, Yoshiji H, Mizumoto Y, Horiguchi K, Shiraiwa K, Tamura K, et al. High incidence of hepatocellular carcinomas induced by a choline deficient L-amino acid defined diet in rats. *Cancer Res*. 1992;52(18):5042-5.
83. C. KD, Naiara B, F. TD, E. SL, Stephanie E, Arne G, et al. Lack of interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducers and activators of transcription-3 signaling in hepatocytes predisposes to liver steatosis and injury in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;51(2):463-73.
84. Masahiko M, Natsuko H, Yoshiyuki S, Akiko U, Toshihiko S, Chiaki T, et al. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *International Journal of Experimental Pathology*. 2013;94(2):93-103.
85. Ikawa-Yoshida A, Matsuo S, Kato A, Ohmori Y, Higashida A, Kaneko E, et al. Hepatocellular carcinoma in a mouse model fed a choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet. *Int J Exp Pathol*. 2017;98(4):221-33.

86. Tsuchida T, Lee YA, Fujiwara N, Ybanez M, Allen B, Martins S, et al. A simple diet- and chemical-induced murine NASH model with rapid progression of steatohepatitis, fibrosis and liver cancer. *Journal of hepatology*. 2018;69(2):385-95.
87. Lai C, Lemke G. An extended family of protein-tyrosine kinase genes differentially expressed in the vertebrate nervous system. *Neuron*. 1991;6(5):691-704.
88. Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, et al. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell*. 1995;80(4):661-70.
89. Ohashi K, Nagata K, Toshima J, Nakano T, Arita H, Tsuda H, et al. Stimulation of sky receptor tyrosine kinase by the product of growth arrest-specific gene 6. *J Biol Chem*. 1995;270(39):22681-4.
90. Kulman JD, Harris JE, Nakazawa N, Ogasawara M, Satake M, Davie EW. Vitamin K-dependent proteins in *Ciona intestinalis*, a basal chordate lacking a blood coagulation cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(43):15794-9.
91. Lemke G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2013;5(11):a009076.
92. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, et al. axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology*. 1991;11(10):5016-31.
93. Graham DK, Dawson TL, Mullaney DL, Snodgrass HR, Earp HS. Cloning and mRNA expression analysis of a novel human protooncogene, c-mer. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 1994;5(6):647-57.
94. Mark MR, Scadden DT, Wang Z, Gu Q, Goddard A, Godowski PJ. rse, a novel receptor-type tyrosine kinase with homology to Axl/Ufo, is expressed at high levels in the brain. *J Biol Chem*. 1994;269(14):10720-8.
95. Dai W, Pan H, Hassanain H, Gupta SL, Murphy MJ, Jr. Molecular cloning of a novel receptor tyrosine kinase, tif, highly expressed in human ovary and testis. *Oncogene*. 1994;9(3):975-9.
96. van der Meer JH, van der Poll T, van 't Veer C. TAM receptors, Gas6, and protein S: roles in inflammation and hemostasis. *Blood*. 2014;123(16):2460-9.
97. Rajotte I, Hasanbasic I, Blostein M. Gas6-mediated signaling is dependent on the engagement of its gamma-carboxyglutamic acid domain with phosphatidylserine. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;376(1):70-3.
98. Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(8):4976-85.
99. Griffin J, Gruber A, Fernandez J. Reevaluation of total, free, and bound protein S and C4b-binding protein levels in plasma anticoagulated with citrate or hirudin. *Blood*. 1992;79(12):3203-11.
100. Balogh I, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlbäck B. Analysis of Gas6 in Human Platelets and Plasma. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005;25(6):1280-6.
101. Nagata K, Ohashi K, Nakano T, Arita H, Zong C, Hanafusa H, et al. Identification of the product of growth arrest-specific gene 6 as a common ligand for Axl, Sky, and Mer receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem*. 1996;271(47):30022-7.
102. Prasad D, Rothlin CV, Burrola P, Burstyn-Cohen T, Lu Q, Garcia de Frutos P, et al. TAM receptor function in the retinal pigment epithelium. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2006;33(1):96-108.
103. Fridell YW, Jin Y, Quilliam LA, Burchert A, McCloskey P, Spizz G, et al. Differential activation of the Ras/extracellular-signal-regulated protein kinase pathway is responsible for the biological consequences induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology*. 1996;16(1):135-45.
104. Braunger J, Schleithoff L, Schulz AS, Kessler H, Lammers R, Ullrich A, et al. Intracellular signaling of the Ufo/Axl receptor tyrosine kinase is mediated mainly by a multi-substrate docking-site. *Oncogene*. 1997;14(22):2619-31.
105. Taylor IC, Roy S, Varmus HE. Overexpression of the Sky receptor tyrosine kinase at the cell surface or in the cytoplasm results in ligand-independent activation. *Oncogene*. 1995;11(12):2619-26.
106. Burchert A, Attar EC, McCloskey P, Fridell Y-WC, Liu ET. Determinants for transformation induced by the Axl receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1998;16:3177.

107. Bellostá P, Costa M, Lin DA, Basilico C. The receptor tyrosine kinase ARK mediates cell aggregation by homophilic binding. *Molecular and cellular biology*. 1995;15(2):614-25.
108. Pierce A, Bliessner B, Xu M, Nielsen-Preiss S, Lemke G, Tobet S, et al. Axl and Tyro3 Modulate Female Reproduction by Influencing Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Survival and Migration. *Molecular Endocrinology*. 2008;22(11):2481-95.
109. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and Dendritic Cells Use Different Axl/Mertk/Tyro3 Receptors in Clearance of Apoptotic Cells. *The Journal of Immunology*. 2007;178(9):5635-42.
110. O'Bryan JP, Fridell YW, Koski R, Varnum B, Liu ET. The transforming receptor tyrosine kinase, Axl, is post-translationally regulated by proteolytic cleavage. *J Biol Chem*. 1995;270(2):551-7.
111. Sather S. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. 2007;109(3):1026-33.
112. Orme JJ, Du Y, Vanarsa K, Mayeux J, Li L, Mutwally A, et al. Heightened cleavage of Axl receptor tyrosine kinase by ADAM metalloproteases may contribute to disease pathogenesis in SLE. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2016;169:58-68.
113. Ekman C, Linder A, Akesson P, Dahlback B. Plasma concentrations of Gas6 (growth arrest specific protein 6) and its soluble tyrosine kinase receptor sAxl in sepsis and systemic inflammatory response syndromes. *Critical care (London, England)*. 2010;14(4):R158.
114. Sather S, Kenyon KD, Lefkowitz JB, Liang X, Varnum BC, Henson PM, et al. A soluble form of the Mer receptor tyrosine kinase inhibits macrophage clearance of apoptotic cells and platelet aggregation. *Blood*. 2007;109(3):1026-33.
115. Ekman C, Stenhoff J, Dahlback B. Gas6 is complexed to the soluble tyrosine kinase receptor Axl in human blood. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(4):838-44.
116. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, et al. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature*. 1999;398(6729):723-8.
117. Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science (New York, NY)*. 2001;293(5528):306-11.
118. Camenisch TD, Koller BH, Earp HS, Matsushima GK. A Novel Receptor Tyrosine Kinase, Mer, Inhibits TNF- α Production and Lipopolysaccharide-Induced Endotoxic Shock. *The Journal of Immunology*. 1999;162(6):3498-503.
119. Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell*. 2007;131(6):1124-36.
120. Zagorska A, Traves PG, Lew ED, Dransfield I, Lemke G. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. *Nature immunology*. 2014;15(10):920-8.
121. Nakanishi Y, Shiratsuchi A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2004;27(1):13-6.
122. Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *The Journal of cell biology*. 1969;42(2):392-403.
123. Wang H, Chen Y, Ge Y, Ma P, Ma Q, Ma J, et al. Immunoexpression of Tyro 3 family receptors--Tyro 3, Axl, and Mer--and their ligand Gas6 in postnatal developing mouse testis. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2005;53(11):1355-64.
124. Suh CH, Hilliard B, Li S, Merrill JT, Cohen PL. TAM receptor ligands in lupus: protein S but not Gas6 levels reflect disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*. 2010;12(4):R146.
125. Ravichandran KS. "Recruitment signals" from apoptotic cells: invitation to a quiet meal. *Cell*. 2003;113(7):817-20.
126. Lemke G, Rothlin CV. Immunobiology of the TAM receptors. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(5):327-36.
127. Seitz HM, Camenisch TD, Lemke G, Earp HS, Matsushima GK. Macrophages and dendritic cells use different Axl/Mertk/Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;178(9):5635-42.
128. Scott RS, McMahon EJ, Pop SM, Reap EA, Caricchio R, Cohen PL, et al. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature*. 2001;411(6834):207-11.
129. Caberoy NB, Zhou Y, Li W. Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *The EMBO journal*. 2010;29(23):3898-910.

130. Caberoy NB, Alvarado G, Bigcas JL, Li W. Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *Journal of cellular physiology*. 2012;227(2):401-7.
131. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, et al. Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature medicine*. 2001;7(2):215-21.
132. Cosemans JM, Van Kruchten R, Olieslagers S, Schurgers LJ, Verheyen FK, Munnix IC, et al. Potentiating role of Gas6 and Tyro3, Axl and Mer (TAM) receptors in human and murine platelet activation and thrombus stabilization. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2010;8(8):1797-808.
133. Hackeng TM, Sere KM, Tans G, Rosing J. Protein S stimulates inhibition of the tissue factor pathway by tissue factor pathway inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(9):3106-11.
134. Caraux A, Lu Q, Fernandez N, Riou S, Di Santo JP, Raulet DH, et al. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. *Nature immunology*. 2006;7(7):747-54.
135. Graham DK, Salzberg DB, Kurtzberg J, Sather S, Matsushima GK, Keating AK, et al. Ectopic expression of the proto-oncogene Mer in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12(9):2662-9.
136. Hong CC, Lay JD, Huang JS, Cheng AL, Tang JL, Lin MT, et al. Receptor tyrosine kinase AXL is induced by chemotherapy drugs and overexpression of AXL confers drug resistance in acute myeloid leukemia. *Cancer letters*. 2008;268(2):314-24.
137. Hutterer M, Knyazev P, Abate A, Reschke M, Maier H, Stefanova N, et al. Axl and growth arrest-specific gene 6 are frequently overexpressed in human gliomas and predict poor prognosis in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2008;14(1):130-8.
138. Keating AK, Kim GK, Jones AE, Donson AM, Ware K, Mulcahy JM, et al. Inhibition of Mer and Axl receptor tyrosine kinases in astrocytoma cells leads to increased apoptosis and improved chemosensitivity. *Molecular cancer therapeutics*. 2010;9(5):1298-307.
139. Craven RJ, Xu LH, Weiner TM, Fridell YW, Dent GA, Srivastava S, et al. Receptor tyrosine kinases expressed in metastatic colon cancer. *International journal of cancer*. 1995;60(6):791-7.
140. Berclaz G, Altermatt HJ, Rohrbach V, Kieffer I, Dreher E, Andres AC. Estrogen dependent expression of the receptor tyrosine kinase axl in normal and malignant human breast. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2001;12(6):819-24.
141. Gjerdrum C, Tiron C, Hoiby T, Stefansson I, Haugen H, Sandal T, et al. Axl is an essential epithelial-to-mesenchymal transition-induced regulator of breast cancer metastasis and patient survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(3):1124-9.
142. Quong RY, Bickford ST, Ing YL, Terman B, Herlyn M, Lassam NJ. Protein kinases in normal and transformed melanocytes. *Melanoma research*. 1994;4(5):313-9.
143. Zhu S, Wurdak H, Wang Y, Galkin A, Tao H, Li J, et al. A genomic screen identifies TYRO3 as a MITF regulator in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(40):17025-30.
144. Koorstra JB, Karikari CA, Feldmann G, Bisht S, Rojas PL, Offerhaus GJ, et al. The Axl receptor tyrosine kinase confers an adverse prognostic influence in pancreatic cancer and represents a new therapeutic target. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(7):618-26.
145. Song X, Wang H, Logsdon CD, Rashid A, Fleming JB, Abbruzzese JL, et al. Overexpression of receptor tyrosine kinase Axl promotes tumor cell invasion and survival in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer*. 2011;117(4):734-43.
146. Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *Journal of cellular physiology*. 2005;204(1):36-44.
147. He L, Zhang J, Jiang L, Jin C, Zhao Y, Yang G, et al. Differential expression of Axl in hepatocellular carcinoma and correlation with tumor lymphatic metastasis. *Molecular carcinogenesis*. 2010;49(10):882-91.
148. Guttridge KL, Luft JC, Dawson TL, Kozlowska E, Mahajan NP, Varnum B, et al. Mer receptor tyrosine kinase signaling: prevention of apoptosis and alteration of cytoskeletal architecture without stimulation or proliferation. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24057-66.
149. van Ginkel PR, Gee RL, Shearer RL, Subramanian L, Walker TM, Albert DM, et al. Expression of the receptor tyrosine kinase Axl promotes ocular melanoma cell survival. *Cancer Res*. 2004;64(1):128-34.
150. Schlegel J, Sambade MJ, Sather S, Moschos SJ, Tan AC, Wings A, et al. MERTK receptor tyrosine kinase is a therapeutic target in melanoma. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(5):2257-67.

151. Goruppi S, Ruaro E, Varnum B, Schneider C. Gas6-mediated survival in NIH3T3 cells activates stress signalling cascade and is independent of Ras. *Oncogene*. 1999;18(29):4224-36.
152. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, et al. Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(2):237-46.
153. Mahajan NP, Earp HS. An SH2 domain-dependent, phosphotyrosine-independent interaction between Vav1 and the Mer receptor tyrosine kinase: a mechanism for localizing guanine nucleotide-exchange factor action. *J Biol Chem*. 2003;278(43):42596-603.
154. Lee Y, Lee M, Kim S. Gas6 induces cancer cell migration and epithelial-mesenchymal transition through upregulation of MAPK and Slug. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;434(1):8-14.
155. Vajkoczy P, Knyazev P, Kunkel A, Capelle HH, Behrndt S, von Tengg-Kobligk H, et al. Dominant-negative inhibition of the Axl receptor tyrosine kinase suppresses brain tumor cell growth and invasion and prolongs survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(15):5799-804.
156. Fridell YW, Villa J, Jr., Attar EC, Liu ET. GAS6 induces Axl-mediated chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1998;273(12):7123-6.
157. Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, et al. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5702-5.
158. Holland SJ, Powell MJ, Franci C, Chan EW, Frieri AM, Atchison RE, et al. Multiple roles for the receptor tyrosine kinase axl in tumor formation. *Cancer Res*. 2005;65(20):9294-303.
159. Loges S, Schmidt T, Tjwa M, van Geyte K, Lievens D, Lutgens E, et al. Malignant cells fuel tumor growth by educating infiltrating leukocytes to produce the mitogen Gas6. *Blood*. 2010;115(11):2264-73.
160. Paolino M, Choidas A, Wallner S, Pranjic B, Uribesalgo I, Loeser S, et al. The E3 ligase Cbl-b and TAM receptors regulate cancer metastasis via natural killer cells. *Nature*. 2014;507(7493):508-12.
161. Qi N, Liu P, Zhang Y, Wu H, Chen Y, Han D. Development of a spontaneous liver disease resembling autoimmune hepatitis in mice lacking tyro3, axl and mer receptor tyrosine kinases. *PLoS One*. 2013;8(6):e66604.
162. Triantafyllou E, Pop OT, Possamai LA, Wilhelm A, Liaskou E, Singanayagam A, et al. MerTK expressing hepatic macrophages promote the resolution of inflammation in acute liver failure. *Gut*. 2018;67(2):333-47.
163. Llacuna L, Barcena C, Bellido-Martin L, Fernandez L, Stefanovic M, Mari M, et al. Growth arrest-specific protein 6 is hepatoprotective against murine ischemia/reperfusion injury. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2010;52(4):1371-9.
164. Lafdil F, Chobert MN, Deveaux V, Zafrani ES, Mavier P, Nakano T, et al. Growth arrest-specific protein 6 deficiency impairs liver tissue repair after acute toxic hepatitis in mice. *Journal of hepatology*. 2009;51(1):55-66.
165. Han J, Bae J, Choi CY, Choi SP, Kang HS, Jo EK, et al. Autophagy induced by AXL receptor tyrosine kinase alleviates acute liver injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in mice. *Autophagy*. 2016;12(12):2326-43.
166. Lafdil F, Chobert MN, Couchie D, Brouillet A, Zafrani ES, Mavier P, et al. Induction of Gas6 protein in CCl4-induced rat liver injury and anti-apoptotic effect on hepatic stellate cells. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2006;44(1):228-39.
167. Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Joannas L, Menendez A, Garcia-Ruiz C, et al. Gas6/Axl pathway is activated in chronic liver disease and its targeting reduces fibrosis via hepatic stellate cell inactivation. *Journal of hepatology*. 2015;63(3):670-8.
168. Fourcot A, Couchie D, Chobert MN, Zafrani ES, Mavier P, Laperche Y, et al. Gas6 deficiency prevents liver inflammation, steatohepatitis, and fibrosis in mice. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;300(6):G1043-53.
169. Petta S, Valenti L, Marra F, Grimaudo S, Tripodo C, Bugianesi E, et al. MERTK rs4374383 polymorphism affects the severity of fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of hepatology*. 2016;64(3):682-90.
170. Mari M, Mari M, Tutusaus A, Garcia de Frutos P, Morales A. Genetic and clinical data reinforce the role of GAS6 and TAM receptors in liver fibrosis. *Cell Death Dis*. 2016;64(4):983-4.
171. Holland SJ, Pan A, Franci C, Hu Y, Chang B, Li W, et al. R428, a Selective Small Molecule Inhibitor of Axl Kinase, Blocks Tumor Spread and Prolongs Survival in Models of Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research*. 2010;70(4):1544-54.

172. Ludwig KF, Du W, Sorrelle NB, Wnuk-Lipinska K, Topalovski M, Toombs JE, et al. Small-Molecule Inhibition of Axl Targets Tumor Immune Suppression and Enhances Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Research*. 2018;78(1):246-55.
173. Vouri M, An Q, Birt M, Pilkington GJ, Hafizi S. Small molecule inhibition of Axl receptor tyrosine kinase potently suppresses multiple malignant properties of glioma cells. *Oncotarget*. 2015;6(18):16183-97.
174. Leconet W, Larbouret C, Chardes T, Thomas G, Neiveyans M, Busson M, et al. Preclinical validation of AXL receptor as a target for antibody-based pancreatic cancer immunotherapy. *Oncogene*. 2014;33(47):5405-14.
175. Ye X, Li Y, Stawicki S, Couto S, Eastham-Anderson J, Kallop D, et al. An anti-Axl monoclonal antibody attenuates xenograft tumor growth and enhances the effect of multiple anticancer therapies. *Oncogene*. 2010;29:5254.
176. Lin CI, Whang EE, Moalem J, Ruan DT. Strategic combination therapy overcomes tyrosine kinase coactivation in adrenocortical carcinoma. *Surgery*. 2012;152(6):1045-50.
177. Burbridge MF, Bossard CJ, Saunier C, Fejes I, Bruno A, Leonce S, et al. S49076 is a novel kinase inhibitor of MET, AXL, and FGFR with strong preclinical activity alone and in association with bevacizumab. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(9):1749-62.
178. Yan SB, Peek VL, Ajamie R, Buchanan SG, Graff JR, Heidler SA, et al. LY2801653 is an orally bioavailable multi-kinase inhibitor with potent activity against MET, MST1R, and other oncoproteins, and displays anti-tumor activities in mouse xenograft models. *Investigational new drugs*. 2013;31(4):833-44.
179. Torka R, Penzes K, Gusenbauer S, Baumann C, Szabadkai I, Orfi L, et al. Activation of HER3 interferes with antitumor effects of Axl receptor tyrosine kinase inhibitors: suggestion of combination therapy. *Neoplasia (New York, NY)*. 2014;16(4):301-18.
180. Feneyrolles C, Spenlinhauer A, Guiet L, Fauvel B, Dayde-Cazals B, Warnault P, et al. Axl kinase as a key target for oncology: focus on small molecule inhibitors. *Molecular cancer therapeutics*. 2014;13(9):2141-8.
181. Zhang YX, Knyazev PG, Cheburkin YV, Sharma K, Knyazev YP, Orfi L, et al. AXL is a potential target for therapeutic intervention in breast cancer progression. *Cancer Res*. 2008;68(6):1905-15.
182. Mahadevan D, Cooke L, Riley C, Swart R, Simons B, Della Croce K, et al. A novel tyrosine kinase switch is a mechanism of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene*. 2007;26(27):3909-19.
183. Liu L, Greger J, Shi H, Liu Y, Greshock J, Annan R, et al. Novel mechanism of lapatinib resistance in HER2-positive breast tumor cells: activation of AXL. *Cancer Res*. 2009;69(17):6871-8.
184. Yakes FM, Chen J, Tan J, Yamaguchi K, Shi Y, Yu P, et al. Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. *Molecular cancer therapeutics*. 2011;10(12):2298-308.
185. Axelrod H, Pienta KJ. Axl as a mediator of cellular growth and survival. *Oncotarget*. 2014;5(19):8818-52.
186. Myers SH, Brunton VG, Unciti-Broceta A. AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2016;59(8):3593-608.
187. Cummings CT, Linger RMA, Cohen RA, Sather S, Kirkpatrick GD, Davies KD, et al. Mer590, a novel monoclonal antibody targeting MER receptor tyrosine kinase, decreases colony formation and increases chemosensitivity in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 2014;5(21):10434-45.
188. Bosurgi L, Bernink JH, Delgado Cuevas V, Gagliani N, Joannas L, Schmid ET, et al. Paradoxical role of the proto-oncogene Axl and Mer receptor tyrosine kinases in colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(32):13091-6.
189. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(2):87-108.
190. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*. 2015;136(5):E359-86.
191. El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2012;142(6):1264-73.e1.
192. Morgan TR, Mandayam S, Jamal MM. Alcohol and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;127(5 Suppl 1):S87-96.

193. Qiu D, Katanoda K, Marugame T, Sobue T. A Joinpoint regression analysis of long-term trends in cancer mortality in Japan (1958-2004). *International journal of cancer*. 2009;124(2):443-8.
194. Bertuccio P, Turati F, Carioli G, Rodriguez T, La Vecchia C, Malvezzi M, et al. Global trends and predictions in hepatocellular carcinoma mortality. *Journal of hepatology*. 2017;67(2):302-9.
195. Chang MH, You SL, Chen CJ, Liu CJ, Lai MW, Wu TC, et al. Long-term Effects of Hepatitis B Immunization of Infants in Preventing Liver Cancer. *Gastroenterology*. 2016;151(3):472-80.e1.
196. Papatheodoridis GV, Chan HL, Hansen BE, Janssen HL, Lampertico P. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. *Journal of hepatology*. 2015;62(4):956-67.
197. Singal AK, Singh A, Jaganmohan S, Guturu P, Mummadi R, Kuo YF, et al. Antiviral therapy reduces risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus-related cirrhosis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010;8(2):192-9.
198. Li WQ, Park Y, McGlynn KA, Hollenbeck AR, Taylor PR, Goldstein AM, et al. Index-based dietary patterns and risk of incident hepatocellular carcinoma and mortality from chronic liver disease in a prospective study. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;60(2):588-97.
199. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2009;49(2):658-64.
200. Schulze K, Imbeaud S, Letouze E, Alexandrov LB, Calderaro J, Rebouissou S, et al. Exome sequencing of hepatocellular carcinomas identifies new mutational signatures and potential therapeutic targets. *Nature genetics*. 2015;47(5):505-11.
201. Stoot JH, Coelen RJ, De Jong MC, Dejong CH. Malignant transformation of hepatocellular adenomas into hepatocellular carcinomas: a systematic review including more than 1600 adenoma cases. *HPB : the official journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association*. 2010;12(8):509-22.
202. Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, Sangro B, Schwartz M, Sherman M, et al. Hepatocellular carcinoma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2:16018.
203. Zucman-Rossi J, Laurent-Puig P. Genetic diversity of hepatocellular carcinomas and its potential impact on targeted therapies. *Pharmacogenomics*. 2007;8(8):997-1003.
204. Aoki H, Kajino K, Arakawa Y, Hino O. Molecular cloning of a rat chromosome putative recombinogenic sequence homologous to the hepatitis B virus encapsidation signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(14):7300-4.
205. Paterlini-Brechot P, Saigo K, Murakami Y, Chami M, Gozuacik D, Mugnier C, et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene. *Oncogene*. 2003;22(25):3911-6.
206. Feitelson MA, Zhu M, Duan LX, London WT. Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 1993;8(5):1109-17.
207. Wang W, Pan Q, Fuhler GM, Smits R, Peppelenbosch MP. Action and function of Wnt/ β -catenin signaling in the progression from chronic hepatitis C to hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastroenterology*. 2017;52(4):419-31.
208. Fukuda K, Tsuchihara K, Hijikata M, Nishiguchi S, Kuroki T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein enhances the activation of the transcription factor, Elk1, in response to mitogenic stimuli. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2001;33(1):159-65.
209. Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M. Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*. 1991;350(6317):429-31.
210. Parkin CA, Ingham PW. The adventures of Sonic Hedgehog in development and repair. I. Hedgehog signaling in gastrointestinal development and disease. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2008;294(2):G363-7.
211. Della Corte CM, Viscardi G, Papaccio F, Esposito G, Martini G, Ciardiello D, et al. Implication of the Hedgehog pathway in hepatocellular carcinoma. *World journal of gastroenterology*. 2017;23(24):4330-40.
212. Villanueva A, Alsinet C, Yanger K, Hoshida Y, Zong Y, Toffanin S, et al. Notch signaling is activated in human hepatocellular carcinoma and induces tumor formation in mice. *Gastroenterology*. 2012;143(6):1660-9.e7.
213. Zhou D, Conrad C, Xia F, Park JS, Payer B, Yin Y, et al. Mst1 and Mst2 maintain hepatocyte quiescence and suppress hepatocellular carcinoma development through inactivation of the Yap1 oncogene. *Cancer cell*. 2009;16(5):425-38.

214. Nault JC, Mallet M, Pilati C, Calderaro J, Bioulac-Sage P, Laurent C, et al. High frequency of telomerase reverse-transcriptase promoter somatic mutations in hepatocellular carcinoma and preneoplastic lesions. *Nature communications*. 2013;4:2218.
215. Tovar V, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Sole M, et al. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *Journal of hepatology*. 2010;52(4):550-9.
216. Ito Y, Takeda T, Sakon M, Tsujimoto M, Higashiyama S, Noda K, et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*. 2001;84(10):1377-83.
217. Kaposi-Novak P, Lee JS, Gómez-Quiroz L, Coulouarn C, Factor VM, Thorgeirsson SS. Met-regulated expression signature defines a subset of human hepatocellular carcinomas with poor prognosis and aggressive phenotype. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(6):1582-95.
218. Schmidt CM, McKillop IH, Cahill PA, Sitzmann JV. Increased MAPK expression and activity in primary human hepatocellular carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;236(1):54-8.
219. Calvisi DF, Ladu S, Conner EA, Seo D, Hsieh JT, Factor VM, et al. Inactivation of Ras GTPase-activating proteins promotes unrestrained activity of wild-type Ras in human liver cancer. *Journal of hepatology*. 2011;54(2):311-9.
220. Delire B, Starkel P. The Ras/MAPK pathway and hepatocarcinoma: pathogenesis and therapeutic implications. *European journal of clinical investigation*. 2015;45(6):609-23.
221. Villanueva A, Chiang DY, Newell P, Peix J, Thung S, Alsinet C, et al. Pivotal role of mTOR signaling in hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2008;135(6):1972-83, 83.e1-11.
222. Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, et al. Halting the interaction between vascular endothelial growth factor and its receptors attenuates liver carcinogenesis in mice. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2004;39(6):1517-24.
223. Miura H, Miyazaki T, Kuroda M, Oka T, Machinami R, Kodama T, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in human hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*. 1997;27(5):854-61.
224. Zhu AX, Duda DG, Sahani DV, Jain RK. HCC and angiogenesis: possible targets and future directions. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2011;8(5):292-301.
225. Wu XZ, Xie GR, Chen D. Hypoxia and hepatocellular carcinoma: The therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2007;22(8):1178-82.
226. Bauer J, Namineni S, Reisinger F, Zoller J, Yuan D, Heikenwalder M. Lymphotoxin, NF- κ B, and cancer: the dark side of cytokines. *Digestive diseases (Basel, Switzerland)*. 2012;30(5):453-68.
227. LeCouter J, Moritz DR, Li B, Phillips GL, Liang XH, Gerber HP, et al. Angiogenesis-independent endothelial protection of liver: role of VEGFR-1. *Science (New York, NY)*. 2003;299(5608):890-3.
228. Taniguchi K, Karin M. IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in immunology*. 2014;26(1):54-74.
229. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, et al. NF- κ B functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*. 2004;431(7007):461-6.
230. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer cell*. 2012;21(4):504-16.
231. Kiraly O, Gong G, Olipitz W, Muthupalani S, Engelward BP. Inflammation-Induced Cell Proliferation Potentiates DNA Damage-Induced Mutations In Vivo. *PLOS Genetics*. 2015;11(2):e1004901.
232. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(4):276-85.
233. Villanueva A, Luedde T. The transition from inflammation to cancer in the liver. *Clinical Liver Disease*. 2016;8(4):89-93.
234. Binnewies M, Roberts EW, Kersten K, Chan V. Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. 2018;24(5):541-50.
235. Coulouarn C, Clement B. Stellate cells and the development of liver cancer: therapeutic potential of targeting the stroma. *Journal of hepatology*. 2014;60(6):1306-9.

236. Coulouarn C, Corlu A, Glaise D, Guenon I, Thorgeirsson SS, Clement B. Hepatocyte-stellate cell cross-talk in the liver engenders a permissive inflammatory microenvironment that drives progression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2012;72(10):2533-42.
237. Barcena C, Stefanovic M, Tutusaus A, Martinez-Nieto GA, Martinez L, Garcia-Ruiz C, et al. Angiogenin secretion from hepatoma cells activates hepatic stellate cells to amplify a self-sustained cycle promoting liver cancer. *Scientific reports.* 2015;5:7916.
238. Mikula M, Proell V, Fischer AN, Mikulits W. Activated hepatic stellate cells induce tumor progression of neoplastic hepatocytes in a TGF-beta dependent fashion. *Journal of cellular physiology.* 2006;209(2):560-7.
239. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet (London, England).* 2018;391(10127):1301-14.
240. Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *The Lancet.* 2018;391(10127):1301-14.
241. Galle PR, Forner A, Llovet JM, Mazzaferro V, Piscaglia F, Raoul J-L, et al. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology.* 2018;69(1):182-236.
242. Llovet JM, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis.* 1999;19(3):329-38.
243. Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2011;53(3):1020-2.
244. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc J-F, et al. Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *New England Journal of Medicine.* 2008;359(4):378-90.
245. Llovet JM, Hernandez-Gea V. Hepatocellular carcinoma: reasons for phase III failure and novel perspectives on trial design. *Clin Cancer Res.* 2014;20(8):2072-9.
246. Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang Y-H, Bodoky G, et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet.* 2017;389(10064):56-66.
247. Kudo M, Finn RS, Qin S, Han KH, Ikeda K, Piscaglia F, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial. *Lancet (London, England).* 2018;391(10126):1163-73.
248. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng A-L, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo B-Y, et al. Cabozantinib (C) versus placebo (P) in patients (pts) with advanced hepatocellular carcinoma (HCC) who have received prior sorafenib: Results from the randomized phase III CELESTIAL trial. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(4_suppl):207-.
249. Crocenzi TS, El-Khoueiry AB, Yau TC, Melero I, Sangro B, Kudo M, et al. Nivolumab (nivo) in sorafenib (sor)-naive and -experienced pts with advanced hepatocellular carcinoma (HCC): CheckMate 040 study. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15_suppl):4013-.
250. Worns MA, Galle PR. HCC therapies--lessons learned. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;11(7):447-52.
251. Lyons JF, Wilhelm S, Hibner B, Bollag G. Discovery of a novel Raf kinase inhibitor. *Endocrine-related cancer.* 2001;8(3):219-25.
252. Wilhelm SM, Carter C, Tang L, Wilkie D, McNabola A, Rong H, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-109.
253. Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncione G, Wilhelm SM, et al. BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants. *Journal of the National Cancer Institute.* 2006;98(5):326-34.
254. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 2006;66(24):11851-8.
255. Sharma A, Trivedi NR, Zimmerman MA, Tuveson DA, Smith CD, Robertson GP. Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. *Cancer Res.* 2005;65(6):2412-21.
256. Strumberg D, Richly H, Hilger RA, Schleucher N, Korfee S, Tewes M, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of the Novel Raf kinase and vascular endothelial growth factor receptor inhibitor BAY 43-9006 in patients with advanced refractory solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2005;23(5):965-72.

257. Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, et al. Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma. *New England Journal of Medicine*. 2007;356(2):125-34.
258. Erber R, Thurnher A, Katsen AD, Groth G, Kerger H, Hammes HP, et al. Combined inhibition of VEGF and PDGF signaling enforces tumor vessel regression by interfering with pericyte-mediated endothelial cell survival mechanisms. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2004;18(2):338-40.
259. Wu JM, Sheng H, Saxena R, Skill NJ, Bhat-Nakshatri P, Yu M, et al. NF-kappaB inhibition in human hepatocellular carcinoma and its potential as adjunct to sorafenib based therapy. *Cancer letters*. 2009;278(2):145-55.
260. Gedaly R, Angulo P, Hundley J, Daily MF, Chen C, Koch A, et al. PI-103 and sorafenib inhibit hepatocellular carcinoma cell proliferation by blocking Ras/Raf/MAPK and PI3K/AKT/mTOR pathways. *Anticancer research*. 2010;30(12):4951-8.
261. Chen KF, Chen HL, Tai WT, Feng WC, Hsu CH, Chen PJ, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway mediates acquired resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2011;337(1):155-61.
262. Yu C, Bruzek LM, Meng XW, Gores GJ, Carter CA, Kaufmann SH, et al. The role of Mcl-1 downregulation in the proapoptotic activity of the multikinase inhibitor BAY 43-9006. *Oncogene*. 2005;24:6861.
263. Rahmani M, Davis EM, Bauer C, Dent P, Grant S. Apoptosis induced by the kinase inhibitor BAY 43-9006 in human leukemia cells involves down-regulation of Mcl-1 through inhibition of translation. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35217-27.
264. Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Hui B, Shi GM, Ke AW, et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis. *Autophagy*. 2011;7(10):1159-72.
265. Tai WT, Shiau CW, Chen HL, Liu CY, Lin CS, Cheng AL, et al. Mcl-1-dependent activation of Beclin 1 mediates autophagic cell death induced by sorafenib and SC-59 in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death & Disease*. 2013;4:e485.
266. Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, et al. Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *International journal of cancer*. 2012;131(3):548-57.
267. Bareford MD, Hamed HA, Tang Y, Cruickshanks N, Burow ME, Fisher PB, et al. Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells. *Autophagy*. 2011;7(10):1261-2.
268. Coriat R, Nicco C, Chereau C, Mir O, Alexandre J, Ropert S, et al. Sorafenib-induced hepatocellular carcinoma cell death depends on reactive oxygen species production in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics*. 2012;11(10):2284-93.
269. Lewis CE, De Palma M, Naldini L. Tie2-expressing monocytes and tumor angiogenesis: regulation by hypoxia and angiopoietin-2. *Cancer Res*. 2007;67(18):8429-32.
270. Wilhelm SM, Dumas J, Adnane L, Lynch M, Carter CA, Schutz G, et al. Regorafenib (BAY 73-4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity. *International journal of cancer*. 2011;129(1):245-55.
271. Kissel M, Berndt S, Fiebig L, Kling S, Ji Q, Gu Q, et al. Antitumor effects of regorafenib and sorafenib in preclinical models of hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017;8(63):107096-108.
272. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*. 2018;25(3):486-541.
273. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972;26(4):239-57.
274. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
275. Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*. 1999;274(17):11549-56.
276. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2008;9(1):47-59.
277. Tait SWG, Green DR. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene*. 2008;27:6452.
278. Sanchis D, Mayorga M, Ballester M, Comella JX. Lack of Apaf-1 expression confers resistance to cytochrome c-driven apoptosis in cardiomyocytes. *Cell death and differentiation*. 2003;10(9):977-86.

279. Chautan M, Chazal G, Cecconi F, Gruss P, Golstein P. Interdigital cell death can occur through a necrotic and caspase-independent pathway. *Current biology : CB*. 1999;9(17):967-70.
280. Colell A, Ricci JE, Tait S, Milasta S, Maurer U, Bouchier-Hayes L, et al. GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*. 2007;129(5):983-97.
281. Tait SWG, Parsons MJ, Llambi F, Bouchier-Hayes L, Connell S, Muñoz-Pinedo C, et al. Resistance to Caspase-Independent Cell Death Requires Persistence of Intact Mitochondria. *Developmental Cell*. 2010;18(5):802-13.
282. Tait SW, Ichim G, Green DR. Die another way--non-apoptotic mechanisms of cell death. *J Cell Sci*. 2014;127(Pt 10):2135-44.
283. Morales A, Mari M, Garcia-Ruiz C, Colell A, Fernandez-Checa JC. Hepatocarcinogenesis and ceramide/cholesterol metabolism. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2012;12(4):364-75.
284. Hannun YA, Obeid LM. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2018;19(3):175-91.
285. Levy M, Futerman AH. Mammalian ceramide synthases. *IUBMB Life*. 2010;62(5):347-56.
286. Morales A, Lee H, Goni FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis*. 2007;12(5):923-39.
287. Tettamanti G, Bassi R, Viani P, Riboni L. Salvage pathways in glycosphingolipid metabolism. *Biochimie*. 2003;85(3-4):423-37.
288. Gangoiti P, Bernacchioni C, Donati C, Cencetti F, Ouro A, Gómez-Muñoz A, et al. Ceramide 1-phosphate stimulates proliferation of C2C12 myoblasts. *Biochimie*. 2012;94(3):597-607.
289. Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, et al. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science (New York, NY)*. 2009;325(5945):1254-7.
290. Carreira AC, Ventura AE, Varela AR, Silva LC. Tackling the biophysical properties of sphingolipids to decipher their biological roles. *Biological chemistry*. 2015;396(6-7):597-609.
291. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, et al. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science (New York, NY)*. 2008;319(5867):1244-7.
292. Guo BB, Bellingham SA, Hill AF. The neutral sphingomyelinase pathway regulates packaging of the prion protein into exosomes. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3455-67.
293. Shen H, Giordano F, Wu Y, Chan J, Zhu C, Milosevic I, et al. Coupling between endocytosis and sphingosine kinase 1 recruitment. *Nature cell biology*. 2014;16(7):652-62.
294. Hayashi Y, Nemoto-Sasaki Y, Tanikawa T, Oka S, Tsuchiya K, Zama K, et al. Sphingomyelin synthase 2, but not sphingomyelin synthase 1, is involved in HIV-1 envelope-mediated membrane fusion. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30842-56.
295. Hla T, Venkataraman K, Michaud J. The vascular S1P gradient—Cellular sources and biological significance. *Biochimica et biophysica acta*. 2008;1781(9):477-82.
296. Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. Expression of the sphingosine 1-phosphate receptor, S1P1, on T-cells controls thymic emigration. *J Biol Chem*. 2004;279(15):15396-401.
297. Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2002;3(8):586-99.
298. van der Weyden L, Arends MJ, Campbell AD, Bald T, Wardle-Jones H, Griggs N, et al. Genome-wide in vivo screen identifies novel host regulators of metastatic colonization. *Nature*. 2017;541(7636):233-6.
299. Venable ME, Lee JY, Smyth MJ, Bielawska A, Obeid LM. Role of ceramide in cellular senescence. *J Biol Chem*. 1995;270(51):30701-8.
300. Ogretmen B, Schady D, Usta J, Wood R, Kravka JM, Luberto C, et al. Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells. *J Biol Chem*. 2001;276(27):24901-10.
301. Marchesini N, Osta W, Bielawski J, Luberto C, Obeid LM, Hannun YA. Role for mammalian neutral sphingomyelinase 2 in confluence-induced growth arrest of MCF7 cells. *J Biol Chem*. 2004;279(24):25101-11.

302. Lee JY, Bielawska AE, Obeid LM. Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Experimental cell research*. 2000;261(2):303-11.
303. Xia P, Gamble JR, Wang L, Pitson SM, Moretti PAB, Wattenberg BW, et al. An oncogenic role of sphingosine kinase. *Current Biology*. 2000;10(23):1527-30.
304. Scarlatti F, Bauvy C, Ventruti A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18384-91.
305. Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem*. 2009;284(5):2719-28.
306. Zhu W, Wang X, Zhou Y, Wang H. C2-ceramide induces cell death and protective autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells. *International journal of molecular sciences*. 2014;15(2):3336-55.
307. Dumitru CA, Gulbins E. TRAIL activates acid sphingomyelinase via a redox mechanism and releases ceramide to trigger apoptosis. *Oncogene*. 2006;25(41):5612-25.
308. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Fernandez-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11369-77.
309. Voelkel-Johnson C, Hannun YA, El-Zawahry A. Resistance to TRAIL is associated with defects in ceramide signaling that can be overcome by exogenous C6-ceramide without requiring down-regulation of cellular FLICE inhibitory protein. *Molecular cancer therapeutics*. 2005;4(9):1320-7.
310. Kashkar H, Wiegmann K, Yazdanpanah B, Haubert D, Kronke M. Acid sphingomyelinase is indispensable for UV light-induced Bax conformational change at the mitochondrial membrane. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20804-13.
311. Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion*. 2006;6(3):118-25.
312. Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, Hallas C, Tchikov V, Winoto-Morbach S, et al. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death and differentiation*. 2004;11(5):550-63.
313. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996;381(6585):800-3.
314. Moles A, Tarrats N, Morales A, Dominguez M, Bataller R, Caballeria J, et al. Acidic sphingomyelinase controls hepatic stellate cell activation and in vivo liver fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2010;177(3):1214-24.
315. Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(8):604-16.
316. Heffernan-Stroud LA, Obeid LM. Sphingosine kinase 1 in cancer. *Advances in cancer research*. 2013;117:201-35.
317. Kawamori T, Kaneshiro T, Okumura M, Maalouf S, Uflacker A, Bielawski J, et al. Role for sphingosine kinase 1 in colon carcinogenesis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(2):405-14.
318. Garcia-Barros M, Coant N, Kawamori T, Wada M, Snider AJ, Truman JP, et al. Role of neutral ceramidase in colon cancer. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(12):4159-71.
319. Bizzozero L, Cazzato D, Cervia D, Assi E, Simbari F, Pagni F, et al. Acid sphingomyelinase determines melanoma progression and metastatic behaviour via the microphthalmia-associated transcription factor signalling pathway. *Cell death and differentiation*. 2014;21(4):507-20.
320. Liu F, Verin AD, Wang P, Day R, Wersto RP, Chrest FJ, et al. Differential regulation of sphingosine-1-phosphate- and VEGF-induced endothelial cell chemotaxis. Involvement of G(alpha2)-linked Rho kinase activity. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2001;24(6):711-9.
321. Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, et al. Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. *Molecular and cellular biology*. 2000;20(24):9247-61.
322. Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, Scotto K, Fuks Z, Kolesnick R. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*. 1995;82(3):405-14.

323. Strum JC, Small GW, Pauig SB, Daniel LW. 1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine stimulates ceramide and diglyceride formation in HL-60 cells. *J Biol Chem.* 1994;269(22):15493-7.
324. Dbaibo GS, Pushkareva MY, Rachid RA, Alter N, Smyth MJ, Obeid LM, et al. p53-dependent ceramide response to genotoxic stress. *The Journal of clinical investigation.* 1998;102(2):329-39.
325. Dubois N, Rio E, Ripoche N, Ferchaud-Roucher V, Gaugler MH, Campion L, et al. Plasma ceramide, a real-time predictive marker of pulmonary and hepatic metastases response to stereotactic body radiation therapy combined with irinotecan. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* 2016;119(2):229-35.
326. Abdul Aziz NA, Mokhtar NM, Harun R, Mollah MMH, Mohamed Rose I, Sagap I, et al. A 19-Gene expression signature as a predictor of survival in colorectal cancer. *BMC Medical Genomics.* 2016;9(1):58.
327. Ogretmen B, Hannun YA. Updates on functions of ceramide in chemotherapy-induced cell death and in multidrug resistance. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy.* 2001;4(6):368-77.
328. Veldman RJ, Klappe K, Hinrichs J, Hummel I, van der Schaaf G, Sietsma H, et al. Altered sphingolipid metabolism in multidrug-resistant ovarian cancer cells is due to uncoupling of glycolipid biosynthesis in the Golgi apparatus. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2002;16(9):1111-3.
329. Morales A, Paris R, Villanueva A, Llacuna L, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Pharmacological inhibition or small interfering RNA targeting acid ceramidase sensitizes hepatoma cells to chemotherapy and reduces tumor growth in vivo. *Oncogene.* 2007;26(6):905-16.
330. Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2001;15(3):719-30.
331. Struckhoff AP, Bittman R, Burow ME, Clejan S, Elliott S, Hammond T, et al. Novel Ceramide Analogs as Potential Chemotherapeutic Agents in Breast Cancer. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2004;309(2):523-32.
332. Stover T, Kester M. Liposomal delivery enhances short-chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2003;307(2):468-75.
333. Liu X, Ryland L, Yang J, Liao A, Aliaga C, Watts R, et al. Targeting of survivin by nanoliposomal ceramide induces complete remission in a rat model of NK-LGL leukemia. *Blood.* 2010;116(20):4192-201.
334. Sweeney EA, Sakakura C, Shirahama T, Masamune A, Ohta H, Hakomori S, et al. Sphingosine and its methylated derivative N,N-dimethylsphingosine (DMS) induce apoptosis in a variety of human cancer cell lines. *International journal of cancer.* 1996;66(3):358-66.
335. Selzner M, Bielawska A, Morse MA, Rudiger HA, Sindram D, Hannun YA, et al. Induction of apoptotic cell death and prevention of tumor growth by ceramide analogues in metastatic human colon cancer. *Cancer Res.* 2001;61(3):1233-40.
336. Mahdy AEM, Cheng JC, Li J, Elojeimy S, Meacham WD, Turner LS, et al. Acid Ceramidase Upregulation in Prostate Cancer Cells Confers Resistance to Radiation: AC Inhibition, a Potential Radiosensitizer. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy.* 2009;17(3):430-8.
337. Weiss M, Hettmer S, Smith P, Ladisch S. Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase. *Cancer Res.* 2003;63(13):3654-8.
338. Huang WC, Tsai CC, Chen CL, Chen TY, Chen YP, Lin YS, et al. Glucosylceramide synthase inhibitor PDMP sensitizes chronic myeloid leukemia T315I mutant to Bcr-Abl inhibitor and cooperatively induces glycogen synthase kinase-3-regulated apoptosis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 2011;25(10):3661-73.
339. Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature.* 1988;335(6189):440-2.
340. McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). *Nature.* 1991;349(6306):254-6.
341. Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, et al. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell.* 1993;74(4):597-608.
342. Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW. MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(8):3516-20.

343. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
344. Lin EY, Orlofsky A, Wang HG, Reed JC, Prystowsky MB. A1, a Bcl-2 family member, prolongs cell survival and permits myeloid differentiation. *Blood*. 1996;87(3):983-92.
345. Kvaisakul M, Hinds MG. The Bcl-2 family: structures, interactions and targets for drug discovery. *Apoptosis*. 2015;20(2):136-50.
346. Sattler M, Liang H, Nettesheim D, Meadows RP, Harlan JE, Eberstadt M, et al. Structure of Bcl-xL-Bak peptide complex: recognition between regulators of apoptosis. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5302):983-6.
347. Liu X, Dai S, Zhu Y, Marrack P, Kappler JW. The structure of a Bcl-xL/Bim fragment complex: implications for Bim function. *Immunity*. 2003;19(3):341-52.
348. Wei MC, Lindsten T, Mootha VK, Weiler S, Gross A, Ashiya M, et al. tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes & development*. 2000;14(16):2060-71.
349. Chen L, Willis SN, Wei A, Smith BJ, Fletcher JI, Hinds MG, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell*. 2005;17(3):393-403.
350. Willis SN, Chen L, Dewson G, Wei A, Naik E, Fletcher JI, et al. Proapoptotic Bak is sequestered by Mcl-1 and Bcl-xL, but not Bcl-2, until displaced by BH3-only proteins. *Genes & development*. 2005;19(11):1294-305.
351. Ding J, Mooers BH, Zhang Z, Kale J, Falcone D, McNichol J, et al. After embedding in membranes antiapoptotic Bcl-XL protein binds both Bcl-2 homology region 3 and helix 1 of proapoptotic Bax protein to inhibit apoptotic mitochondrial permeabilization. *J Biol Chem*. 2014;289(17):11873-96.
352. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *The EMBO journal*. 1998;17(14):3878-85.
353. Cheng EH, Wei MC, Weiler S, Flavell RA, Mak TW, Lindsten T, et al. BCL-2, BCL-X(L) sequester BH3 domain-only molecules preventing BAX- and BAK-mediated mitochondrial apoptosis. *Molecular cell*. 2001;8(3):705-11.
354. Merino D, Giam M, Hughes PD, Siggs OM, Heger K, O'Reilly LA, et al. The role of BH3-only protein Bim extends beyond inhibiting Bcl-2-like prosurvival proteins. *The Journal of cell biology*. 2009;186(3):355-62.
355. O'Connor L, Strasser A, O'Reilly LA, Hausmann G, Adams JM, Cory S, et al. Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal*. 1998;17(2):384-95.
356. Du H, Wolf J, Schafer B, Moldoveanu T, Chipuk JE, Kuwana T. BH3 domains other than Bim and Bid can directly activate Bax/Bak. *J Biol Chem*. 2011;286(1):491-501.
357. Moldoveanu T, Grace CR, Llambi F, Nourse A, Fitzgerald P, Gehring K, et al. BID-induced structural changes in BAK promote apoptosis. *Nature structural & molecular biology*. 2013;20(5):589-97.
358. Sarosiek KA, Chi X, Bachman JA, Sims JJ, Montero J, Patel L, et al. BID preferentially activates BAK while BIM preferentially activates BAX, affecting chemotherapy response. *Molecular cell*. 2013;51(6):751-65.
359. Gavathiotis E, Suzuki M, Davis ML, Pitter K, Bird GH, Katz SG, et al. BAX activation is initiated at a novel interaction site. *Nature*. 2008;455(7216):1076-81.
360. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer cell*. 2002;2(3):183-92.
361. Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (New York, NY)*. 2001;292(5517):727-30.
362. Wagner KU, Claudio E, Rucker EB, 3rd, Riedlinger G, Broussard C, Schwartzberg PL, et al. Conditional deletion of the Bcl-x gene from erythroid cells results in hemolytic anemia and profound splenomegaly. *Development (Cambridge, England)*. 2000;127(22):4949-58.
363. Cory S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annual review of immunology*. 1995;13:513-43.
364. Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(4):1126-32.
365. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

366. Campos L, Rouault JP, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon C, et al. High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Blood*. 1993;81(11):3091-6.
367. Wendel H-G, Silva RLA, Malina A, Mills JR, Zhu H, Ueda T, et al. Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes & development*. 2007;21(24):3232-7.
368. Strik H, Deininger M, Streffer J, Grote E, Wickboldt J, Dichgans J, et al. BCL-2 Family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 1999;67(6):763-8.
369. Maji S, Samal SK, Pattanaik L, Panda S, Quinn BA, Das SK, et al. Mcl-1 is an important therapeutic target for oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget*. 2015;6(18):16623-37.
370. Krajewska M, Krajewski S, Epstein JI, Shabaik A, Sauvageot J, Song K, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers. *Am J Pathol*. 1996;148(5):1567-76.
371. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5302):967-9.
372. Villunger A, Michalak EM, Coultas L, Mullauer F, Bock G, Ausserlechner MJ, et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science (New York, NY)*. 2003;302(5647):1036-8.
373. Maji S, Panda S, Samal SK, Shriwas O, Rath R, Pellicchia M, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Family Proteins and Chemoresistance in Cancer. *Advances in cancer research*. 2018;137:37-75.
374. Wertz IE, Kusam S, Lam C, Okamoto T, Sandoval W, Anderson DJ, et al. Sensitivity to antitubulin chemotherapeutics is regulated by MCL1 and FBW7. *Nature*. 2011;471(7336):110-4.
375. Tabuchi Y, Matsuoka J, Gunduz M, Imada T, Ono R, Ito M, et al. Resistance to paclitaxel therapy is related with Bcl-2 expression through an estrogen receptor mediated pathway in breast cancer. *International journal of oncology*. 2009;34(2):313-9.
376. Brotin E, Meryet-Figuere M, Simonin K, Duval RE, Villedieu M, Leroy-Dudal J, et al. Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *International journal of cancer*. 2010;126(4):885-95.
377. Lestini BJ, Goldsmith KC, Fluchel MN, Liu X, Chen NL, Goyal B, et al. Mcl1 downregulation sensitizes neuroblastoma to cytotoxic chemotherapy and small molecule Bcl2-family antagonists. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(16):1587-95.
378. Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H. Expression and role of Bcl-xL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2001;34(1):55-61.
379. Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, Weber A, Biesterfeld S, Muller M, et al. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma. *International journal of oncology*. 2006;28(1):25-32.
380. Galmiche A, Ezzoukry Z, Francois C, Louandre C, Sabbagh C, Nguyen-Khac E, et al. BAD, a proapoptotic member of the BCL2 family, is a potential therapeutic target in hepatocellular carcinoma. *Molecular cancer research : MCR*. 2010;8(8):1116-25.
381. Hu Y-W, Chen Z-P, Hu X-M, Zhao J-Y, Huang J-L, Ma X, et al. The miR-573/apoM/Bcl2A1-dependent signal transduction pathway is essential for hepatocyte apoptosis and hepatocarcinogenesis. *Apoptosis*. 2015;20(10):1321-37.
382. Yang F, Li QJ, Gong ZB, Zhou L, You N, Wang S, et al. MicroRNA-34a targets Bcl-2 and sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to sorafenib treatment. *Technology in cancer research & treatment*. 2014;13(1):77-86.
383. Hu Y, Pang E, Lai PB, Squire JA, MacGregor PF, Beheshti B, et al. Genetic alterations in doxorubicin-resistant hepatocellular carcinoma cells: a combined study of spectral karyotyping, positional expression profiling and candidate genes. *International journal of oncology*. 2004;25(5):1357-64.
384. Zhou M, Zhang Q, Zhao J, Liao M, Wen S, Yang M. Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. *Oncology reports*. 2017;38(3):1742-50.
385. Sarosiek KA, Fraser C, Muthalagu N, Bholra PD, Chang W, McBrayer SK, et al. Developmental Regulation of Mitochondrial Apoptosis by c-Myc Governs Age- and Tissue-Specific Sensitivity to Cancer Therapeutics. *Cancer cell*. 2017;31(1):142-56.
386. Ni Chonghaile T, Sarosiek KA, Vo TT, Ryan JA, Tammareddi A, Moore Vdel G, et al. Pretreatment mitochondrial priming correlates with clinical response to cytotoxic chemotherapy. *Science (New York, NY)*. 2011;334(6059):1129-33.

387. Montero J, Letai A. Why do BCL-2 inhibitors work and where should we use them in the clinic? *Cell death and differentiation*. 2017;25:56.
388. Al-Harbi S, Hill BT, Mazumder S, Singh K, Devecchio J, Choudhary G, et al. An antiapoptotic BCL-2 family expression index predicts the response of chronic lymphocytic leukemia to ABT-737. *Blood*. 2011;118(13):3579-90.
389. Montero J, Sarosiek KA, DeAngelo JD, Maertens O, Ryan J, Ercan D, et al. Drug-induced death signaling strategy rapidly predicts cancer response to chemotherapy. *Cell*. 2015;160(5):977-89.
390. Moore VDG, Letai A. BH3 profiling – measuring integrated function of the mitochondrial apoptotic pathway to predict cell fate decisions. *Cancer letters*. 2013;332(2):202-5.
391. Fesik SW. Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5:876.
392. Klasa RJ, Gillum AM, Klem RE, Frankel SR. Oblimersen Bcl-2 antisense: facilitating apoptosis in anticancer treatment. *Antisense & nucleic acid drug development*. 2002;12(3):193-213.
393. Tse C, Shoemaker AR, Adickes J, Anderson MG, Chen J, Jin S, et al. ABT-263: a potent and orally bioavailable Bcl-2 family inhibitor. *Cancer Res*. 2008;68(9):3421-8.
394. Shoemaker AR, Mitten MJ, Adickes J, Ackler S, Refici M, Ferguson D, et al. Activity of the Bcl-2 family inhibitor ABT-263 in a panel of small cell lung cancer xenograft models. *Clin Cancer Res*. 2008;14(11):3268-77.
395. Gandhi L, Camidge DR, Oliveira MRd, Bonomi P, Gandara D, Khaira D, et al. Phase I Study of Navitoclax (ABT-263), a Novel Bcl-2 Family Inhibitor, in Patients With Small-Cell Lung Cancer and Other Solid Tumors. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(7):909-16.
396. Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, et al. Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(5):488-96.
397. Yecies D, Carlson NE, Deng J, Letai A. Acquired resistance to ABT-737 in lymphoma cells that up-regulate MCL-1 and BFL-1. *Blood*. 2010;115(16):3304-13.
398. Roberts AW, Advani RH, Kahl BS, Persky D, Sweetenham JW, Carney DA, et al. Phase 1 study of the safety, pharmacokinetics, and antitumour activity of the BCL2 inhibitor navitoclax in combination with rituximab in patients with relapsed or refractory CD20+ lymphoid malignancies. *British journal of haematology*. 2015;170(5):669-78.
399. Roberts AW, Davids MS, Pagel JM, Kahl BS, Puvvada SD, Gerecitano JF, et al. Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2016;374(4):311-22.
400. Stilgenbauer S, Eichhorst B, Schetelig J, Coutre S, Seymour JF, Munir T, et al. Venetoclax in relapsed or refractory chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion: a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(6):768-78.
401. Knepper TC, Saller J, Walko CM. Novel and Expanded Oncology Drug Approvals of 2016-PART 2: New Options in the Management of Hematologic Malignancies. *Oncology (Williston Park, NY)*. 2017;31(2):138-46.
402. Konopleva M, Pollyea DA, Potluri J, Chyla B, Hogdal L, Busman T, et al. Efficacy and Biological Correlates of Response in a Phase II Study of Venetoclax Monotherapy in Patients with Acute Myelogenous Leukemia. *Cancer discovery*. 2016;6(10):1106-17.
403. Matulis SM, Gupta VA, Nooka AK, Hollen HV, Kaufman JL, Lonial S, et al. Dexamethasone treatment promotes Bcl-2 dependence in multiple myeloma resulting in sensitivity to venetoclax. *Leukemia*. 2016;30(5):1086-93.
404. Cervantes-Gomez F, Lamothe B, Woyach JA, Wierda WG, Keating MJ, Balakrishnan K, et al. Pharmacological and Protein Profiling Suggests Venetoclax (ABT-199) as Optimal Partner with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res*. 2015;21(16):3705-15.
405. Adams JM, Cory S. The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell death and differentiation*. 2018;25(1):27-36.
406. Lessene G, Czabotar PE, Sleebs BE, Zobel K, Lowes KN, Adams JM, et al. Structure-guided design of a selective BCL-X(L) inhibitor. *Nature chemical biology*. 2013;9(6):390-7.
407. Tao Z-F, Hasvold L, Wang L, Wang X, Petros AM, Park CH, et al. Discovery of a Potent and Selective BCL-XL Inhibitor with in Vivo Activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 2014;5(10):1088-93.

408. Kotschy A, Szlavik Z, Murray J, Davidson J, Maragno AL, Le Toumelin-Braizat G, et al. The MCL1 inhibitor S63845 is tolerable and effective in diverse cancer models. *Nature*. 2016;538(7626):477-82.
409. Merino D, Whittle JR, Vaillant F, Serrano A, Gong J-N, Giner G, et al. Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. *Science translational medicine*. 2017;9(401).
410. Stefanovic M, Tutusaus A, Martinez-Nieto GA, Barcena C, de Gregorio E, Moutinho C, et al. Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7(7):8253-67.
411. Wang B, Ni Z, Dai X, Qin L, Li X, Xu L, et al. The Bcl-2/xL inhibitor ABT-263 increases the stability of Mcl-1 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells. *Molecular cancer*. 2014;13:98.
412. Armengol C, Tarafa G, Boix L, Sole M, Queral R, Costa D, et al. Orthotopic implantation of human hepatocellular carcinoma in mice: analysis of tumor progression and establishment of the BCLC-9 cell line. *Clin Cancer Res*. 2004;10(6):2150-7.
413. Liu SB, Ikenaga N, Peng ZW, Sverdlov DY, Greenstein A, Smith V, et al. Lysyl oxidase activity contributes to collagen stabilization during liver fibrosis progression and limits spontaneous fibrosis reversal in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2016;30(4):1599-609.
414. Bourd-Boittin K, Basset L, Bonnier D, L'Helgoualc'h A, Samson M, Théret N. CX3CL1/fractalkine shedding by human hepatic stellate cells: contribution to chronic inflammation in the liver. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2009;13(8a):1526-35.
415. Dengler M, Staufer K, Huber H, Stauber R, Bantel H, Weiss KH, et al. Soluble Axl is an accurate biomarker of cirrhosis and hepatocellular carcinoma development: results from a large scale multicenter analysis. *Oncotarget*. 2017;8(28):46234-48.
416. Staufer K, Dengler M, Huber H, Marculescu R, Stauber R, Lackner C, et al. The non-invasive serum biomarker soluble Axl accurately detects advanced liver fibrosis and cirrhosis. *Cell Death Dis*. 2017;8(10):e3135.
417. Alciato F, Sainaghi PP, Sola D, Castello L, Avanzi GC. TNF-alpha, IL-6, and IL-1 expression is inhibited by GAS6 in monocytes/macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):869-75.
418. Espindola MS, Habel DM, Narayanan R, Jones I, Coelho AL, Murray LA, et al. Targeting of TAM Receptors Ameliorates Fibrotic Mechanisms in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2018;197(11):1443-56.
419. Guo Z, Li Y, Zhang D, Ma J. Axl inhibition induces the antitumor immune response which can be further potentiated by PD-1 blockade in the mouse cancer models. *Oncotarget*. 2017;8(52):89761-74.
420. Abou-Alfa GK, Meyer T, Cheng AL, El-Khoueiry AB, Rimassa L, Ryoo BY, et al. Cabozantinib in Patients with Advanced and Progressing Hepatocellular Carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2018;379(1):54-63.
421. Shayman JA. ELIGLUSTAT TARTRATE: Glucosylceramide Synthase Inhibitor Treatment of Type 1 Gaucher Disease. *Drugs of the future*. 2010;35(8):613-20.
422. Tepper AD, Diks SH, van Blitterswijk WJ, Borst J. Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34810-7.
423. Tagaram HR, Divittore NA, Barth BM, Kaiser JM, Avella D, Kimchi ET, et al. Nanoliposomal ceramide prevents in vivo growth of hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2011;60(5):695-701.
424. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature chemical biology*. 2012;8(10):831-8.
425. Tait SWG, Green DR. Cell survival in tough times: The mitochondrial recovery plan. *Cell Cycle*. 2010;9(21):4254-5.
426. Tesori V, Piscaglia AC, Samengo D, Barba M, Bernardini C, Scatena R, et al. The multikinase inhibitor Sorafenib enhances glycolysis and synergizes with glycolysis blockade for cancer cell killing. *Scientific reports*. 2015;5:9149.
427. Lee H, Rotolo JA, Mesicek J, Penate-Medina T, Rimner A, Liao W-C, et al. Mitochondrial Ceramide-Rich Macrodomeins Functionalize Bax upon Irradiation. *PLOS ONE*. 2011;6(6):e19783.
428. Chipuk JE, McStay GP, Bharti A, Kuwana T, Clarke CJ, Siskind LJ, et al. Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis. *Cell*. 2012;148(5):988-1000.

429. Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem.* 1999;274(29):20296-300.
430. Chiu WH, Su WC, Li CL, Chen CL, Lin CF. An increase in glucosylceramide synthase induces Bcl-xL-mediated cell survival in vinorelbine-resistant lung adenocarcinoma cells. *Oncotarget.* 2015;6(24):20513-24.
431. Montero J, Letai A. Dynamic BH3 profiling-poking cancer cells with a stick. *Molecular & Cellular Oncology.* 2016;3(3).
432. Chang KT, Anishkin A, Patwardhan GA, Beverly LJ, Siskind LJ, Colombini M. Ceramide channels: destabilization by Bcl-xL and role in apoptosis. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1848(10 Pt A):2374-84.
433. Anja M, S. A-SM, E. TC, P. OHS, L. SP, Camille Z, et al. Targeting senescent cholangiocytes and activated fibroblasts with B-cell lymphoma-extra large inhibitors ameliorates fibrosis in multidrug resistance 2 gene knockout (Mdr2^{-/-}) mice. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2018;67(1):247-59.
434. Rimola J, Diaz-Gonzalez A, Darnell A, Varela M, Pons F, Hernandez-Guerra M, et al. Complete response under sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma: Relationship with dermatologic adverse events. *Hepatology (Baltimore, Md).* 2017.
435. Touzeau C, Ryan J, Guerriero JL, Moreau P, Chonghaile TN, Gouill SL, et al. BH3-profiling identifies heterogeneous dependency on Bcl-2 family members in Multiple Myeloma and predicts sensitivity to BH3 mimetics. *Leukemia.* 2016;30(3):761-4.
436. Lindner AU, Salvucci M, Morgan C, Monsefi N, Resler AJ, Cremona M, et al. BCL-2 system analysis identifies high-risk colorectal cancer patients. *Gut.* 2017;66(12):2141-8.

ANEXO



Barcelona, 25 de Septiembre de 2018

El Dr. Albert Morales y la Dra. Montserrat Marí, codirectores de la tesis doctoral "Identificación de dianas terapéuticas en fibrosis hepática y cáncer" realizada por la doctoranda Anna Tutusaus López informan de su participación en los artículos que componen esta tesis:

En el artículo "Targeting glucosylceramide synthase upregulation reverts sorafenib resistance in experimental hepatocellular carcinoma" publicado en Oncotarget, la doctoranda ha participado activamente en el desarrollo y la realización de los experimentos. En particular, su actuación ha sido principal en la caracterización de la afectación mitocondrial del sorafenib y en el desarrollo y análisis de los modelos tumorales murinos.

En el artículo "Antiapoptotic BCL-2 proteins determine sorafenib/regorafenib resistance and BH3-mimetic efficacy in hepatocellular carcinoma" publicado también en Oncotarget la doctoranda es la principal responsable del diseño de experimentos así como su desarrollo y realización.

La revista Oncotarget es una revista del primer cuartil (Q1, 49/362) en oncología en el ranking Scopus/SJR con un Scopus index de 4.67, siendo su último factor de impacto de 5.168.

Por último, declaramos que ninguno de los artículos ha sido utilizado para la elaboración de otras tesis doctorales.

Dr. Albert Morales, Co-director

Dra. Montserrat Marí, Co-directora

ROSELLÓ 161, 6ª PLANTA
08036 BARCELONA
TEL.: 93 363 83 00
FAX: 93 363 83 01