

biodonostia

osasun ikerketa institutua
instituto de investigación sanitaria

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

**Departamento de Fisiología
Facultad de Medicina y Odontología**

**Papel de las vesículas extracelulares en
el diagnóstico y patogenia del
colangiocarcinoma**

Tesis presentada por

Ander Arbelaiz Cossío

Tesis dirigida por

Dr. D. Jesús María Bañales Asurmendi

Dr. D. Luis Bujanda Fernández de Piérola

Donostia, 11 de octubre de 2017

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis directores de tesis los Drs. Jesús Bañales y Luis Bujanda la oportunidad de poder realizar la tesis doctoral en su grupo, la ayuda prestada y los conocimientos que me han transmitido. A Txus por su intento de promocionar a todo el equipo y que aprendiésemos cómo funciona el mundo científico, por estar pendiente del proyecto y por las ideas científicas aportadas. A Luis por su ayuda y apoyo siempre que lo he requerido, por transmitirme abundantes conocimientos médicos, por su cercanía y por estar siempre pendiente del funcionamiento del laboratorio.

A los miembros clínicos del grupo, Raúl y Adelaida por la predisposición a trascender la labor asistencial, por el afán y esfuerzo de mejorar la calidad de vida de sus pacientes y todo el esfuerzo que han invertido en investigar. Creo que no hubiera podido aguantar la tesis sin tus pastas Adelaida.

A mis amigos del grupo de enfermedades hepáticas del Instituto de Investigación Biodonostia, sin los que este trabajo no habría sido posible, por su apoyo y ayuda incondicionales que me han brindado, por estar en los momentos difíciles, pero sobre todo por todos esos momentos magníficos que hemos vivido, tanto en el laboratorio como fuera de él. Como toda buena historia esta ha tenido momentos buenos y otros que no lo han sido tanto, pero la unión que hemos establecido, para brindar sosiego en situaciones adversas y disfrute en todas las demás, habla sobre la gran amistad que hemos forjado, el mayor tesoro posible.

A Matxus por ser uno de los referentes en mi aprendizaje como investigador, por transmitirme el valor del pensamiento científico, del trabajo bien hecho y enseñarme los fundamentos de las técnicas y trabajo en el laboratorio.

A Oihane, Patricia, Álvaro, Aitor, Ibone, Laura, Paula, Elisa, Myriam, Javi y Puyi (sorry because of the spanish), por ser los mejores compañeros que he podido tener.

Por vuestro apoyo incondicional y la ayuda que me habéis brindado en todo momento. Gracias por hacer que haya disfrutado de esta profesión es un verdadero placer y un privilegio haber podido compartir con vosotros estos años en el laboratorio, haber aprendido y disfrutado con vosotros y por todos los momentos compartidos. Me habéis hecho mejor científico, pero sobre todo mejor persona, gracias Amigos!

A Ainhoa porque has tenido que aguantarme más que ninguno, espero que no te haya hecho sufrir mucho con mi desorden y anarquía...y por cargar los rotes de las centris! Gracias por haberme ayudado sin ninguna duda y con la mejor de las predisposiciones, pero sobre todo por tu curiosidad, por tus ganas de aprender, por hacerme mejor investigador pero sobre todo mejor persona, por haberme brindado los mejores momentos como investigador y haberme hecho sentir el placer de la ciencia, el placer de descubrir nuestro mundo.

A todos los colaboradores, del servicio de proteómica del CIC bioGUNE Mikel, Félix, Iraide, a los clínicos del Hospital de Cruces, César y Alberto a Marcin y el laboratorio de metabolómica del CIC bioGUNE, que han contribuido de manera crucial a la consecución del proyecto, por su predisposición, esfuerzo y grandísimo trabajo y experiencia.

Por último, quiero agradecer a Mayela todo su cariño y apoyo. Y a mi familia por estar siempre a mi lado.

Abreviaturas

4F24C	<i>Cell-surface antigen heavy chain</i>
A1AG1	<i>Alpha-1-acid glycoprotein</i>
ADAM10	<i>Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10</i>
AJCC	<i>7th edition of the American Joint Committee on Cancer</i>
AFP	Alfa fetoproteína
AMPN	<i>Aminopeptidase N</i>
ANXA5	<i>Annexin A5</i>
Arf6	<i>ADP-ribosylation factor 6</i>
AUC	Área debajo de la curva, en inglés <i>area under de curve</i>
BAIP2	<i>Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BTEA	Bicarbonato de trietilamina
CA19-9	<i>Carbohydrate antigen 19-9</i>
CC	Componentes celulares
CCA	Colangiocarcinoma
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand</i>
CDCP1	<i>CUB domain-containing protein 1</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEIC	Comités de Ética para la Investigación Clínica
CF	Fibrosis quística, en inglés <i>cystic fibrosis</i>
CIB1	<i>Calcium and integrin-binding protein 1</i>
CPRE	Colangiopancreatografía retrógrada endoscópica
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
CRP	<i>C reactive protein</i>
CT	Tomografía axial computerizada, en inglés <i>computerized tomography</i>
CXCL1	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
dCCA	Colangiocarcinoma distal
DMA	Dimetil amiloride
DSC	Disociación sujeta a colisión
DTT	Ditiotreitol
EASL	Asociación Europea para el Estudio del Hígado, del inglés <i>European Association for the Study of the Liver</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EPCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>

EPS8	<i>Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8</i>
EV	<i>Extracellular vesicles</i>
FASP	preparación de muestra asistida por filtro, en inglés <i>filter aided sample preparation</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FCN1	<i>Ficolin-1</i>
FCN2	<i>Ficolin-2</i>
FDR	Proporción de descubrimientos falsos, en inglés <i>false discovery rate</i>
FIBG	<i>Fibrinogen gamma chain</i>
FILMA	<i>Filamin A</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FM	Funciones moleculares
FN1	Fibronectin
FXR	<i>Farnesoid X-activated recertor</i>
GGT1	<i>Gamma-glutamyltranspeptidase 1</i>
GO	<i>Gene ontology</i>
GRP78	<i>78 kDa glucose-regulated protein homolog</i>
HCC	Carcinoma hepatocelular, del inglés <i>Hepatocellular carcinoma</i>
HGFR	<i>Hepatocyte growth factor receptor</i>
Hh	<i>Hedgehog</i>
HRS	<i>Hepatocyte growth factor tyrosine kinase substrate</i>
HSP90AA1	<i>Heat shock protein 90 alpha</i>
iCCA	Colangiocarcinoma intrahepático
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
IGHA1	<i>Immunoglobulin heavy constant alpha 1</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ILK	<i>Integrin-linked protein kinase</i>
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
iNOS	<i>Nitric oxide synthase</i>
ITGB4	<i>Integrin beta-4</i>
ITIH2	<i>Inter-alpha-trypsin inhibitor</i>
KPYM	<i>Pyruvate kinase</i>
MS	Espectrometría de masas, del inglés <i>mass spectrometry</i>
MRI	Resonancia magnética nuclear, en inglés <i>Magnetic resonance imaging</i>
MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
LAT1	<i>Large neutral amino acids transporter small subunit 1</i>
LG3BP	<i>Galectin-3-binding protein</i>

NEP	<i>Neprilysin</i>
NHC	Colangiocitos humanos normales, del inglés <i>normal human cholangiocytes</i>
NTA	<i>Nanoparticle tracking analysis</i>
PB	Procesos biológicos
PBC	Colangitis biliar primaria, en inglés <i>primary biliary cholangitis</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
pCCA	Colangiocarcinoma perihilar
PLD	enfermedad poliquística hepática, en inglés <i>polycystic liver disease</i>
PIGR	<i>Polymeric immunoglobulin receptor</i>
Ppm	Partes por millón
P/S	<i>Penicillin/Streptomycin</i>
PSC	Colangitis esclerosante primaria, en inglés <i>primary sclerosing cholangitis</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
Rpm	Revoluciones por minuto
S10A8	S100A8
SDS	Sodio dodecil sulfato
SEM	Error estándar de la media, del inglés <i>standard error of the mean</i>
STAM	<i>Signal transduction adaptor molecule 1</i>
STOM	<i>Erythrocyte band 7 integral membrane protein</i>
TA	Temperatura ambiente
TACSTD2	<i>Tumor-associated signal transducer 2</i>
TEM	microscopía electrónica de transmisión, en inglés <i>transmission electron microscopy</i>
TGFB	<i>Transforming growth factor beta</i>
TSG101	<i>Tumor susceptibility gene 101 protein</i>
UPLC	Cromatógrafo líquido de alto rendimiento, del inglés <i>ultra high performance liquid chromatography</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VL	Vesículas lumbales
VNN1	<i>Pantetheinase 1</i>
VTDB	<i>Vitamin D-binding protein</i>
WCE	Extracto celular total, en inglés <i>Whole cell extract</i>

Índice

Introducción

I.1 El hígado

I.2 El tracto biliar

I2.1 Anatomía

I2.2 Colangiocitos

I2.3 Colangiopatías

I.3 Colangiocarcinoma

I3.1 Aspectos generales

I3.2 Clasificación

I3.3 Factores de riesgo

I3.4 Mecanismos moleculares de colangiocarcinogénesis

I3.5 Diagnóstico

I3.6 Tratamiento

I.4 Vesículas extracelulares

I4.1 Características

I4.2 Las EVs en la fisiopatología biliar

I4.3 Las EVs en cáncer

I4.4 Las EVs en la patogenia del colangiocarcinoma

I4.5 Valor diagnóstico y terapéutico de las vesículas extracelulares en cáncer

Hipótesis y objetivos

Materiales y métodos

M.1 Pacientes

M.2 Cultivos celulares

M.3 Modelos animales

M.3.1 Modelo murino de CCA orto-tópico

M.4 Aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares (EVs)

M.4.1 Aislamiento de las EVs

M.4.2 Microscopía electrónica de transmisión

M.4.3 *Nanoparticle tracking analysis* (NTA)

M.4.4 Inmunoblot

M.4.5 Inmunofluorescencia

M.5 Análisis proteómico

M.5.1 Extracción proteica y preparación de muestras asistida por filtro

M.5.2 Análisis por espectrometría de masas

M.5.3 Bases de datos

M.5.4 Análisis mediante progenesis

M.5.5 Análisis funcional *in silico*

M.5.6 Calculo de biomarcadores

M.6 Proliferación celular

M.7 Migración celular

M.8 Análisis estadístico

Resultados

R.1 Caracterización de EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos

R.2 Análisis del contenido proteico de las EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos

R.3 Caracterización de EVs derivadas de colangiocitos humanos normales y células de colangiocarcinoma humano en cultivo

R.4 Análisis del contenido proteico de EVs y extractos celulares totales (WCE) derivados de colangiocitos normales y células de CCA

R.5 Análisis del papel oncogénico autocrino/paracrino de EVs derivadas de células de CCA

**R.6 Determinación de la presencia de EVs de origen humano en suero
de ratones inmunodeficientes con implantes orto-tópicos de CCA
humano**

Discusión

Conclusiones

Bibliografía

Introducción

Introducción

I.1. Hígado

El hígado es el órgano de mayor tamaño del cuerpo humano y realiza múltiples funciones vitales tales como almacenamiento de nutrientes (glucógeno, vitaminas, minerales, etc.), producción de bilis para facilitar la absorción de grasas y vitaminas liposolubles en la digestión, síntesis de numerosas proteínas plasmáticas (albúmina, lipoproteínas, factores de coagulación, enzimas, aminoácidos no esenciales, etc.) y lípidos (triglicéridos y colesterol), y detoxificación de sustancias nocivas^[1].

A nivel celular, el hígado está compuesto por células epiteliales, endoteliales y células del estroma. Las células epiteliales las constituyen los hepatocitos, que forman el parénquima hepático, y las células que forman los conductos biliares llamadas colangiocitos. Las células endoteliales son células sinusoidales que forman los capilares hepáticos, mientras que las células presentes en el estroma hepático están compuestas por fibroblastos, células inmunes (entre las que destacan las células de Kupffer o macrófagos hepáticos), mastocitos y leucocitos^[1].

Los hepatocitos son el tipo celular más abundante del hígado (~80%) y realizan la mayor parte de las funciones hepáticas. Los colangiocitos, pese a representar entre un 3-5% de todas las células de hígado realizan funciones claves tales como producción, regulación y transporte de la bilis. El resto de células no epiteliales participan en el mantenimiento estructural, funcional y defensa del órgano.

A nivel estructural, la unidad funcional hepática principal son los lobulillos hepáticos, estructuras poliédricas, principalmente hexágonos, formadas por láminas de hepatocitos en disposición radial en torno a una vena central. En la parte externa de los lobulillos se encuentra la tríada portal, formada por una rama de la vena porta, una arteria y el conducto biliar (Fig. I1).

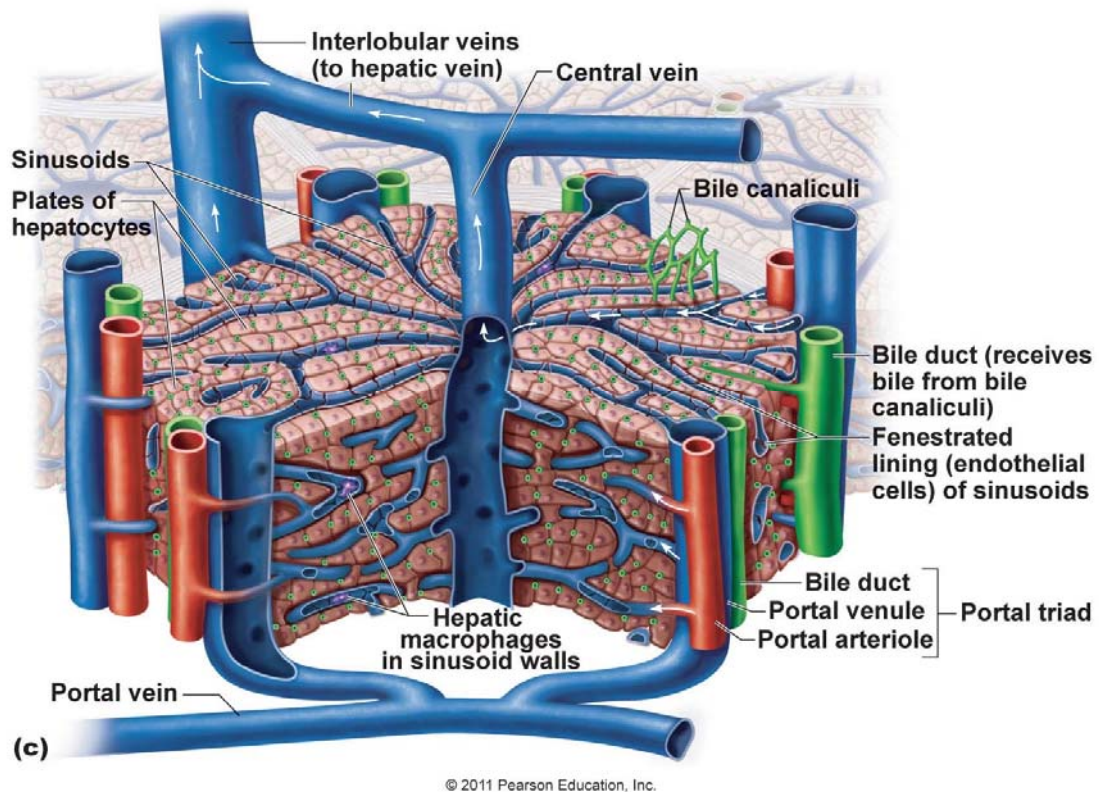


Figura I.1. Estructura de los lobulillos hepáticos. 2011 Pearson Education, Inc.
<https://www.pinterest.se/pin/369928556874116837/>

I.2. Tracto biliar

I.2.1 Anatomía

El tracto o vía biliar lo forma un sistema de conductos, recubiertos por colangiocitos, que regulan la producción y composición de la bilis generada en el hígado y la transportan hasta el intestino delgado (duodeno). La bilis generada en los canalículos de los hepatocitos fluye por los conductos biliares de las tríadas portales y posteriormente por los conductos hepáticos derecho e izquierdo que se unifican en el conducto hepático común. Éste se une con el conducto cístico que conduce a la vesícula biliar, formando el conducto biliar común (o colédoco) que desemboca en el duodeno (Fig. I2). Anatómicamente, el tracto biliar se divide en conductos biliares intrahepáticos (pequeños conductillos dentro del hígado), perihilar (zona entre la confluencia de los conductos hepáticos derecho e izquierdo hasta la confluencia del conducto cístico con el colédoco) y distal (colédoco)^[2].

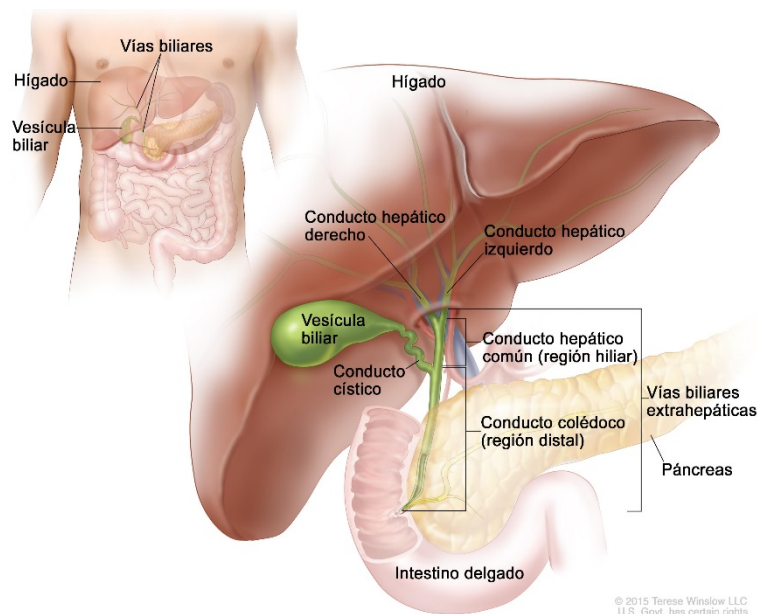


Figura I2. Anatomía del tracto biliar. 2015 Terese Winslow LLC.
<https://www.cancer.gov/images/cdr/live/CDR668855.jpg>

1.2.2. Colangiocitos

Los colangiocitos son células importantes para el correcto funcionamiento del hígado. Desde un punto de vista biológico, estas células son claves en la regulación de la composición de la bilis generada en los hepatocitos, favoreciendo la reabsorción de sales biliares así como su alcalinización y fluidificación de la bilis resultando en un fluido rico en bicarbonato capaz de neutralizar en el duodeno el pH ácido proveniente del estómago tras la ingesta alimenticia^[3]. Para poder realizar correctamente estas funciones los colangiocitos poseen un cilio primario que se extiende desde la membrana apical hasta el lumen ductular. Esta organela tiene propiedades mecano-, quimio- y osmo-sensoras, a través de las cuales detectan cambios en la composición bilis y son capaces de regularla según las necesidades^[4-6] (Fig. I3).

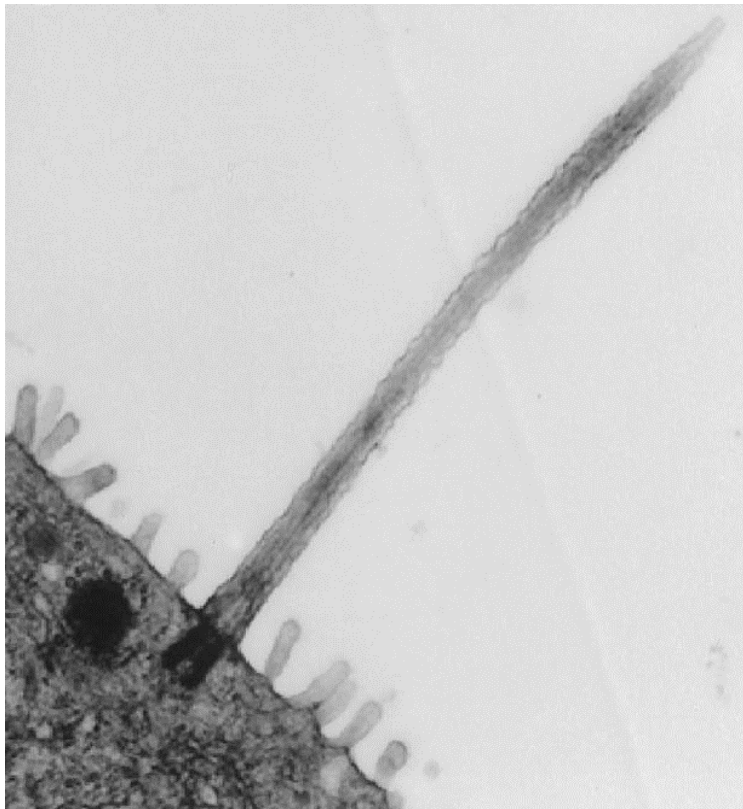


Figura I3. Cilio primario de los colangiocitos. Imagen representativa de microscopía electrónica de transmisión de un colangiocito de rata^[7].

1.2.3 Colangiopatías

Desde un punto de vista patológico, los colangiocitos son diana de diversas enfermedades llamadas “colangiopatías”^[8]. Según su etiología, las colangiopatías se clasifican en: a) asociadas con procesos autoinmunes [tales como la colangitis biliar primaria^[8] (PBC, en inglés colangitis biliar primaria) y la colangitis esclerosante primaria^[9] (PSC, en inglés primary sclerosing cholangitis), etc.], b) infecciosas (*Cryptosporidium parvum*^[10], etc.), c) genéticas [enfermedad hepática poliquística^[11] (PLD, en inglés *polycystic liver diseases*), fibrosis quística^[12] (CF, en inglés *cystic fibrosis*), síndrome de Alagille^[13], etc.], d) causadas por alteraciones vasculares (colangiopatías post-isquémicas^[14], etc.), e) neoplásicas (cáncer biliar o colangiocarcinoma^[15]), f) inducidas por fármacos (fluoracilo, etc)^[16], o g) idiopáticas (atresia biliar^[17], sarcoidosis biliar idiopática^[18], etc.) (Fig. I4). Estas patologías biliares suelen estar caracterizadas por inflamación crónica, reacción ductular y fibrosis periductular^[8].

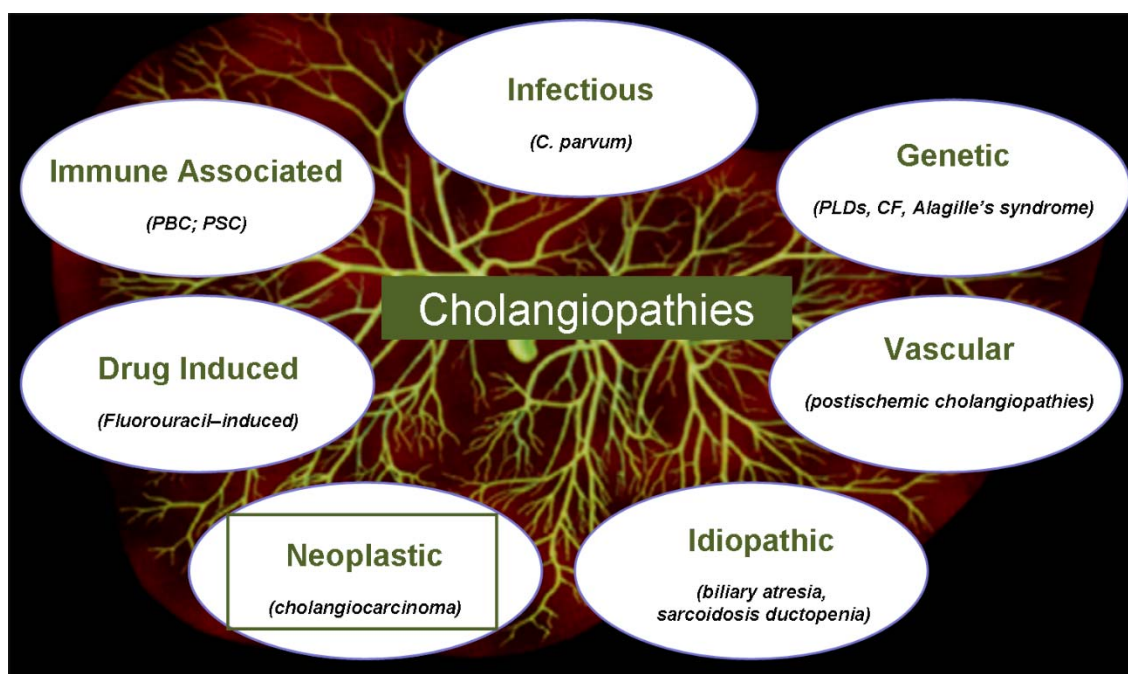


Figura I4. Diagrama de las etiologías más relevantes asociadas a colangiopatías.

I.3 Colangiocarcinoma

I.3.1 Aspectos generales

El colangiocarcinoma (*cholangiocarcinoma*, CCA) agrupa a un conjunto heterogéneo de tumores con características (marcadores) de diferenciación biliar. Es el segundo tipo más frecuente de cáncer de hígado primario tras el carcinoma hepatocelular (HCC, en inglés *hepatocellular carcinoma*) y representa el ~3% de los tumores gastrointestinales. El CCA se origina principalmente por la transformación maligna de las células epiteliales biliares (colangiocitos), aunque también pueden generarse a partir de células madre hepáticas o de células progenitoras de la glándula peribiliar^[19]. Se trata de un tumor poco frecuente, con una incidencia media a nivel global que no sobrepasa los 6 casos por 100.000 habitantes^[15, 20]. Sin embargo, en regiones del sudeste asiático (China, Tailandia, Corea del Sur) su incidencia puede sobrepasar dicha cifra llegando a más de 80 casos por 100.000 habitantes debido a la infección de parásitos hepáticos endémicos que predisponen a su desarrollo (tales como *Opisthorchis viverrini* or *Clonorchis sinensis*)^[20]. Este tumor presenta mayor incidencia en hombres que en mujeres y la edad media de su diagnóstico se sitúa en torno a los 70 años^[20, 21].

I.3.2 Clasificación

En la actualidad no existe un consenso sobre cuál es la mejor clasificación de los CCAs. La clasificación más contemporánea se basa en la localización anatómica y distingue entre CCAs intrahepáticos (iCCA), perihiliares (pCCA) y distales (dCCA). Los iCCAs se localizan en los conductos biliares pequeños dentro del hígado antes de llegar a los conductos biliares hepáticos derecho e izquierdo. Los pCCAs se localizan alrededor de la confluencia de los conductos biliares hepáticos derecho e izquierdo, y los dCCAs en el colédoco^[22]. Teniendo en cuenta el modo de crecimiento de estos tumores, el iCCA puede presentar tres tipos de crecimiento: a) masa de células

tumorales afectando tanto al conducto biliar como al parénquima hepático, b) periductal infiltrante, cuando las células cancerígenas crecen dentro del conducto biliar e infiltran la pared del conducto y, c) intraductal, con un crecimiento tumoral de tipo papilar en el interior de los conductos biliares^[23, 24]. La mayoría de los CCAs presentan un crecimiento en forma de masa tumoral, aunque los CCA perihiliares suelen también presentar un crecimiento de periductal infiltrante (Fig. 15)^[23].

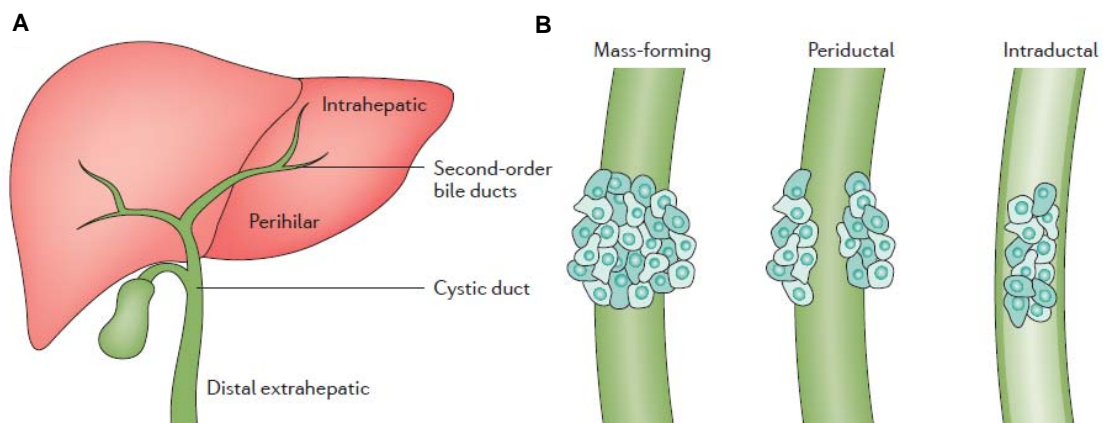


Figura 15. Clasificación del CCA. A) Clasificación anatómica de los CCAs. B) Diferentes patrones de crecimiento de los CCAs^[20].

En cuanto a sus características histológicas, los CCAs perihiliares y distales se caracterizan por ser en general adenocarcinomas mucinosos, mientras que los intrahepáticos son más heterogéneos y normalmente se distinguen dos subtipos, uno que muestra un patrón mucinoso (“tipo ductal biliar”) y que puede tener un patrón de crecimiento tanto en masa como periductular infiltrante o ductular y otro que presenta un patrón mixto (“tipo ductular biliar”) que se asocia normalmente con un patrón de crecimiento en masa^[25-27].

1.3.3. Factores de riesgo

La mayor parte de los CCAs presentan una etiología desconocida en el momento del diagnóstico^[15, 20, 21]. Sin embargo, diversos factores de riesgo predisponen a su desarrollo tales como infecciones ciertos parásitos hepáticos, la presencia de ciertas

patologías biliares como la colangitis esclerosante primaria (PSC), malformaciones de la vía biliar (enfermedad de Caroli y quistes biliares), hepatolitiasis, infecciones virales crónicas [hepatitis víricas B (VHB) o C (VHC)], síndrome metabólico o la exposición a ciertas sustancias tóxicas (Alcohol, tabaco, asbestos, nitrosaminas, etc.)^[20]. Las infecciones por los parásitos hepáticos *Opisthorchis viverrini* y *Clonorchis sinensis* son un importante factor de riesgo para el desarrollo del CCA intrahepático en regiones del Sudeste Asiático donde este tipo de CCA presenta una alta incidencia y supone el principal cáncer hepático primario^[20]. Entre los pacientes con PSC (incidencia mundial: ~1/100.000) existe un 10-15% de riesgo de desarrollar CCA^[28-30], mientras que en el caso de la enfermedad de Caroli ese riesgo es de entre 6-30%^[31, 32]. Otras condiciones, tales como la presencia de hepatolitiasis también predisponen al desarrollo de iCCA en un ~7%^[33]. Todas estas patologías cursan en general con procesos inflamatorios crónicos asociados con fibrosis y reacción ductular como mecanismos de respuesta al daño tisular^[20], los cuales a su vez favorecen la transformación neoplásica de los colangiocitos^[34].

1.3.4 Mecanismos moleculares de colangiocarcinogénesis

Los cambios celulares necesarios para el desarrollo y progresión del cáncer son múltiples, heterogéneos y complejos. Entre ellos destaca la adquisición de mecanismos de proliferación continuada, supervivencia celular, angiogénesis, y de invasión y colonización de otros tejidos^[34, 35]. Para la activación de todos estos mecanismos son necesarios cambios genéticos, epigenéticos y moleculares dentro de las células diana, los cuales pueden ser heredados o adquiridos a lo largo de la vida haciendo del CCA una patología tremendamente compleja^[20].

Alteraciones genéticas y epigenéticas

Diversos estudios han mostrado la heterogeneidad genómica presente en el CCA. Muchas de estas alteraciones genéticas presentes en los CCA afectan a genes clave en la promoción del crecimiento celular (*KRAS*, *BRAF*, *SMAD4*, *FGFR2*, *EGFR*,

PTPN3, *NOTCH*, *WNT*)^[36-41] control y mantenimiento de la estabilidad genómica (*TP53*)^[36], y remodelación de la cromatina (*KMT2C*, *ARID1A*, *PBRM1* and *BAP1*)^[40, 42]. Es importante destacar que los CCAs suelen presentar con cierta frecuencia mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, que codifican para las isoformas de la *isocitrate dehydrogenase 1* y *2*, respectivamente, las cuales participan en el cambio de patrón de metilación de la célula^[43-45] afectando a vías de señalización importantes como *Wnt*^[46] *transforming growth factor beta* (*TGFB*)^[46, 47] o *PI3K*^[46].

Vías de señalización

En el desarrollo y progresión del CCA se activan numerosas vías de señalización que promueven la tumorigénesis celular. Entre estas vías de señalización destacan diversos factores endocrinos y neuroendocrinos, factores de crecimiento, compuestos biliares, vías señalización del desarrollo o rutas pro-inflamatorias.

- *Factores endocrinos y de crecimiento*: varias hormonas y factores de crecimiento promueven el crecimiento celular y de supervivencia de las células de CCA. Así, los estrógenos favorecen la proliferación de las células de CCA^[48] y la expresión de factores pro-tumorales clave como *interleukin-6* (*IL6*) y *vascular endothelial growth factor* (*VEGF*)^[49, 50]. Factores tales como serotonina, dopamina, leptina, opioides y 2-araquidonoilglicerol favorecen también la proliferación de las células de CCA^[51-56]. Por otro lado, la expresión del *epidermal growth factor receptor* (*EGFR*) y del *hepatocyte growth factor receptor* (*HGFR*) se encuentra aumentada en tejido de CCA^[57-60], favoreciendo la proliferación, desdiferenciación y metástasis tumoral^[61-64].

- *Compuestos biliares*: un porcentaje de los CCAs están asociados con colestasis. Los ácidos biliares no son genotóxicos *per se* pero favorecen la proliferación celular y la inflamación^[65]. Así, los ácidos biliares son capaces de activar *EGFR* y estimular la proliferación celular^[66]. El ácido quenodeoxicólico reduce la expresión del receptor de ácidos biliares *farnesoid X-activated receptor* (*FXR*) promoviendo el crecimiento

tumoral *in vivo*^[67]. Los ácidos biliares conjugados también promueven el crecimiento del CCA a través del *sphingosine 1-receptor 2*^[68, 69].

- *Vías de señalización del desarrollo embrionario*: varias de las vías de señalización importantes en el desarrollo embrionario están activadas e implicadas en desarrollo y progresión del CCA. Entre ellas destacan *Notch* y *Hedgehog* (Hh), las cuales participan en el crecimiento, supervivencia y diseminación del CCA^[70-73].

- *Factores inflamatorios*: se han identificado dos subtipos de iCCA, uno caracterizado por la activación de señales pro-inflamatorias y otro asociado a vías de señalización proliferativas^[74]. La citoquina IL-6 es secretada por las células de CCA favoreciendo su propio crecimiento y supervivencia celular^[75, 76]. Otra citoquina importante en la biología del CCA es TGFβ que promueve la invasión y migración celular induciendo la transición epitelio-mesenquimal de las células de CCA^[77, 78]. Por otro lado, la enzima *cyclooxygenase-2* (COX2) es activada por diversas señales inflamatorias favoreciendo la carcinogénesis del CCA^[79, 80]. COX2, junto con otras citoquinas pro-inflamatorias, induce la activación de la *nitric oxide synthase* (iNOS) que produce óxido nítrico promoviendo la carcinogénesis por daño del DNA de forma directa y por inhibición de los mecanismos de reparación^[81, 82].

- *Estroma tumoral*: el CCA se caracteriza por presentar un prominente estroma compuesto principalmente por fibroblastos y macrófagos que interaccionan con las células de CCA estimulando el desarrollo tumoral y condicionando la respuesta a tratamientos quimioterápicos^[83-85]. Durante el desarrollo del CCA las células del estroma sobre-expresan genes relacionados con promoción del ciclo celular, generación de matriz extracelular y procesos inflamatorios que correlacionan con un mal pronóstico^[86, 87].

1.3.5 Diagnóstico

El CCA se caracteriza por ser, en general, un tipo de cáncer asintomático en estadios iniciales, lo cual conlleva a un diagnóstico tardío y alta probabilidad de

diseminación a otros tejidos y órganos. Este hecho junto con la elevada quimiorresistencia que presentan estos tumores limitan en gran medida las posibles opciones terapéuticas y hacen que este tumor tenga en la actualidad muy mal pronóstico^[20]. Entre los síntomas que presentan los pacientes en el diagnóstico destacan dolor abdominal, malestar, fatiga, pérdida drástica de peso, sudoración nocturna o ictericia, entre otros^[20]. El diagnóstico del CCA se realiza generalmente mediante la combinación de técnicas de imagen [resonancia magnética nuclear (MRI, en inglés *magnetic resonance imaging*) o colangiopancreatografía retrógrada endoscópica (CPRE)], análisis de los niveles de marcadores tumorales generales en suero *carbohydrate antigen 19-9* (CA19-9), *carcinoembryonic antigen* (CEA) y estudio de biopsia tumoral (Fig. 16)^[20]. Sin embargo, las técnicas diagnósticas no invasivas actuales (i.e. imagen y marcadores tumorales en suero) presentan baja sensibilidad y especificidad en estadios iniciales de la enfermedad. Este hecho es especialmente relevante y crítico para los grupos de pacientes con riesgo de desarrollar CCA. En este sentido, la mitad de los pacientes PSC que desarrollan CCA lo hacen en los primeros dos años desde su diagnóstico^[30] y las técnicas de imagen actuales presentan limitaciones para discernir entre la estenosis biliar benigna o maligna. Además, el análisis genómico mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH) de las células de los conductos biliares obtenidas por cepillado biliar tienen una sensibilidad limitada^[88]. Otras limitaciones importantes de estas técnicas diagnósticas son su invasividad y/o posibilidad de uso repetido para monitorización de la enfermedad.

Por todo ello, es necesario la búsqueda de nuevos métodos diagnósticos eficaces, de carácter poco invasivo, de coste económico bajo y alta accesibilidad. En este sentido, la detección de los niveles de ciertos marcadores tumorales generales en suero es una alternativa pero presenta importantes limitaciones. En el caso de la PSC, un ~30% de los pacientes presentan elevados niveles de este biomarcador debido a la colangitis y colestasis asociada, y no se asocia con presencia tumoral después de un

largo periodo de seguimiento^[89, 90]. Además, entre un 5-10% de la población no produce CA19-9, lo que limita su utilidad^[91].

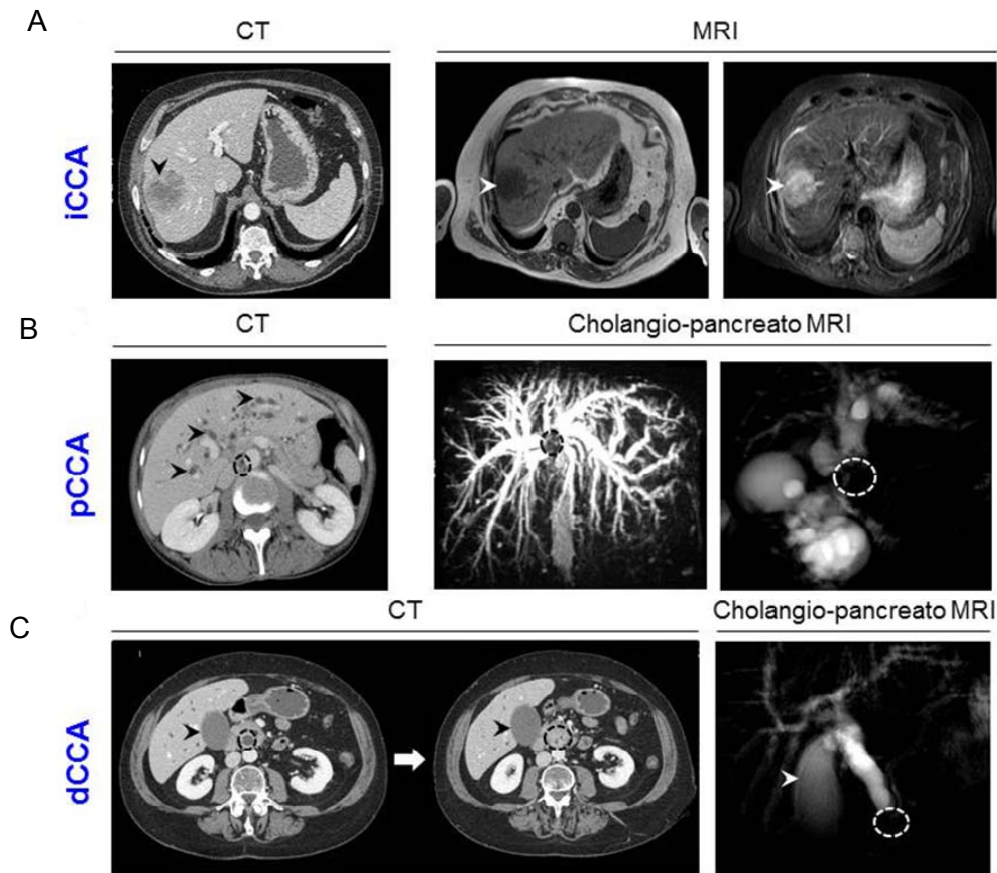


Figura I6. Diagnóstico del CCA mediante tomografía axial computerizada (CT, en inglés computerized tomography) y MRI. Imágenes representativas de A) iCCA (flecha), B) pCCA [círculo y dilatación de los conductos biliares intrahepáticos (flechas)]. C) dCCA [círculo y distensión de la vesícula biliar (flecha)]^[34]

1.3.6 Tratamiento

Actualmente, el único tratamiento potencialmente curativo para el CCA es la resección quirúrgica del tumor o el trasplante hepático, los cuales solo son aplicables en casos muy concretos y bajo estrictos criterios clínicos^[92]. Así, en menos de un tercio de los pacientes está indicada la resección quirúrgica tumoral debido a presencia de infiltración local del tumor, invasión vascular o linfática, metástasis, dificultades para la posterior reconstrucción del tracto biliar o presencia de un daño hepático que puede comprometer la supervivencia del paciente durante la intervención^[20]. Además, los

pacientes que se someten a tratamiento quirúrgico presentan una alta recurrencia de la enfermedad, presentando una supervivencia a 5 años de entre el 22-44% para el iCCA, 11-41% para el pCCA y 27-37% para el dCCA^[93]. Cuando el tratamiento quirúrgico no es posible, se aplica generalmente tratamientos paliativos basados en quimioterapia y/o colocación de *stents* biliares para mejorar el flujo biliar, los cuales prolongan escasamente la supervivencia de los pacientes^[94]. En la actualidad, la primera línea de tratamiento quimioterápico para los pacientes con CCA es la combinación de gemcitabina y cisplatino^[95], la cual incrementa ligeramente su supervivencia^[96]. Cuando el tratamiento de primera línea falla no existe un tratamiento de segunda línea con eficacia clínica demostrada^[97]. En los últimos años, se está estudiando el potencial de las terapias locorregionales basadas principalmente en radioembolización transarterial, ablación con radiofrecuencia y terapia fotodinámica como tratamientos paliativos^[20]. Además, se están llevando a cabo diversos ensayos pre-clínicos y clínicos con terapias dirigidas frente a diversas mutaciones o alteraciones moleculares, tales como mutaciones en *isocitrate dehydrogenase* (IDH)^[98], microRNAs^[99, 100], genes de fusión^[101, 102], o tratamientos dirigidos contra el estroma tumoral^[103].

I.4 Vesículas extracelulares

I.4.1 Características

Las vesículas extracelulares (EVs, del inglés *extracellular vesicles*) son esferas lipídicas que contienen un lumen acuoso y están rodeadas por una bicapa lipídica (Fig. 17). Éstas son producidas por diversos tipos celulares y liberadas al medio extracelular conteniendo diversas biomoléculas (proteínas, lípidos, RNA, DNA y metabolitos). En relación a su biogénesis, las EVs se clasifican en exosomas, microvesículas o micropartículas y cuerpos apoptóticos (Fig 18)^[104].

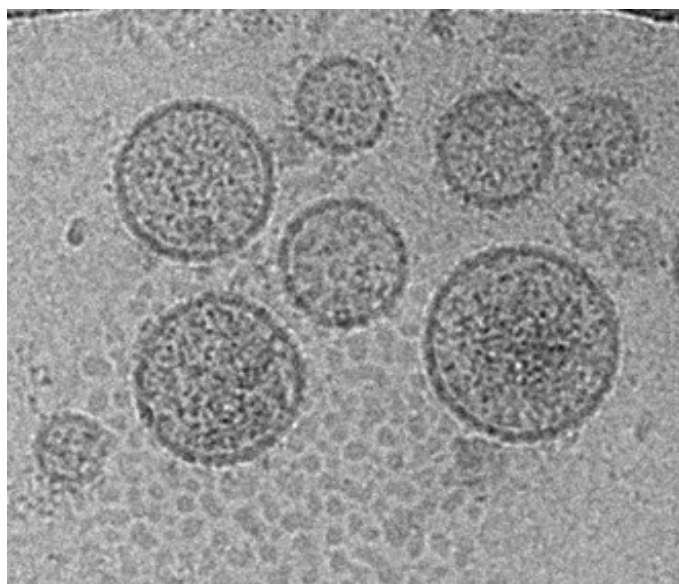


Figura 17. Imagen de microscopía electrónica de EVs secretadas por colangiocitos tumorales en cultivo.

Los exosomas son EVs producidas en los cuerpos multivesiculares (MVB) de las células a partir de los endosomas tempranos provenientes de la membrana plasmática celular, y su morfología es redondeada y su tamaño ronda entre 40-150 nm^[104-106]. Las microvesículas o micropartículas se forman directamente en la membrana plasmática celular por evaginación de la misma para ser liberados al medio extracelular. Estas vesículas presentan una morfología redondeada y tamaño más heterogéneo, de entre 40 nm a más de 1000 nm^[106, 107]. Por último, los cuerpos apoptóticos son EVs producidas a partir de células en proceso de apoptosis que presentan una gran heterogeneidad en forma y tamaño (40 - >5000 nm).

EV TYPE	ORIGIN	MORPHOLOGY	SIZE (nm)
Exosomes	Multivesicular body (MVB)	Spherical	~40 - 150
Microvesicles or microparticles	Plasma membrane	Spherical	~40 - <1000
Apoptotic bodies	Apoptotic cell	Heterogeneous	~100 - 5000

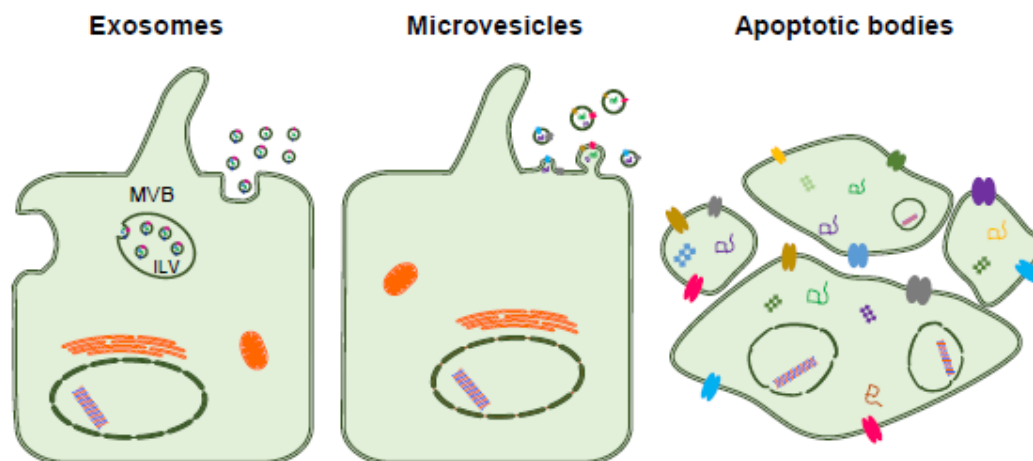


Figura I8. Representación de los diferentes tipos de EVs de acuerdo con su biogénesis y características generales^[108].

Las EVs se encuentran presentes en distintos fluidos biológicos tales como suero, plasma, orina, bilis, saliva, leche, líquido ascítico y fluido seminal, entre otros^[109, 110], y son capaces de regular múltiples procesos fisiopatológicos a través de la transferencia de su contenido específico (i.e. proteínas, lípidos, RNA codificante y no codificante, DNA y metabolitos) a las células y tejidos diana. En este sentido, las EVs son capaces de regular la respuesta inmune^[109, 111], la homeostasis del sistema circulatorio^[109], la embriogénesis mediando la comunicación materno-fetal^[109, 112], y la reparación de tejidos^[109, 113, 114], entre otros.

1.4.2 Las EVs en la fisiopatología biliar

Diversos estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de las EVs en la regulación de distintos procesos fisiopatológicos en el hígado. A nivel patológico, las EVs participan en la regulación de la esteatohepatitis no alcohólica, hepatitis

alcohólica, hepatitis virales, regeneración hepática, daño hepático producido por fármacos, fibrosis hepática, colangiopatías y cánceres hepatobiliares (CCA y carcinoma hepatocelular, HCC)^[115].

En 2010, se descubrió la presencia de EVs en bilis y su papel inhibiendo la proliferación de los colangiocitos a través de su interacción con el cilio primario de la célula^[116]. Además, se comprobó que parte de las EVs presentes en bilis son secretadas por los colangiocitos, pudiendo tener un papel importante en los mecanismos de homeostasis del epitelio biliar^[116]. A nivel patológico, se ha comprobado que las EVs derivadas de pacientes con colangitis biliar primaria (PBC) pueden tener efectos inmunomoduladores sobre células presentadores de antígenos de la sangre (monocitos y células dendríticas). Así, se observó que la incubación autóloga de EVs de plasma junto con células monoculeadas de sangre periférica (PBMCs) indujo cambios en la abundancia de moléculas co-estimuladoras (CD86, CD80 y CD40) en monocitos y células dendríticas. Estas EVs de plasma de pacientes con PBC presentaron cambios en su contenido de microRNAs, entre los que se encontraban algunos relacionados con la regulación de células inmunes^[117]. Además, se ha indicado recientemente el papel de los cuerpos apoptóticos en la regulación de la patogénesis de PBC, en coherencia con la patogénesis de esta enfermedad que se caracteriza por destrucción progresiva de las células del epitelio biliar^[118] resultado en la liberación de cuerpos apoptóticos capaces de regular la respuesta inflamatoria e inmunológica en esta la enfermedad^[119].

1.4.3 Las EVs en cáncer

El estudio del papel de las EVs en el desarrollo y progresión del cáncer es un campo de especial y creciente interés en los últimos años, y tiene como principal objetivo el poder determinar nuevos mecanismos relevantes en el desarrollo de estas patologías, así como desarrollar nuevas herramientas diagnósticas/pronósticas y estrategias terapéuticas.

Las EVs secretadas por células tumorales son capaces de transmitir señales oncogénicas de manera autocrina y paracrina a través del traspaso de RNAs y proteínas pro-tumorales^[120-122]. Así, las EVs pueden regular diversos procesos clave en la progresión tumoral tales como la proliferación, supervivencia, dediferenciación, invasión/migración de las células cancerígenas^[121, 123-126], así como la modulación del estroma para la producción de factores inflamatorios^[127], remodelación de la matriz extracelular^[128], neovascularización o angiogénesis^[129, 130], procesos de quimioresistencia celular^[131-133], preparación del nicho metastásico en otros órganos^[134, 135] o la inhibición de la respuesta inmune anti-tumoral^[136-138] (Fig. 19). En estos procesos participan EVs producidas por las propias células tumorales así como por las células del estroma tumoral^[139].

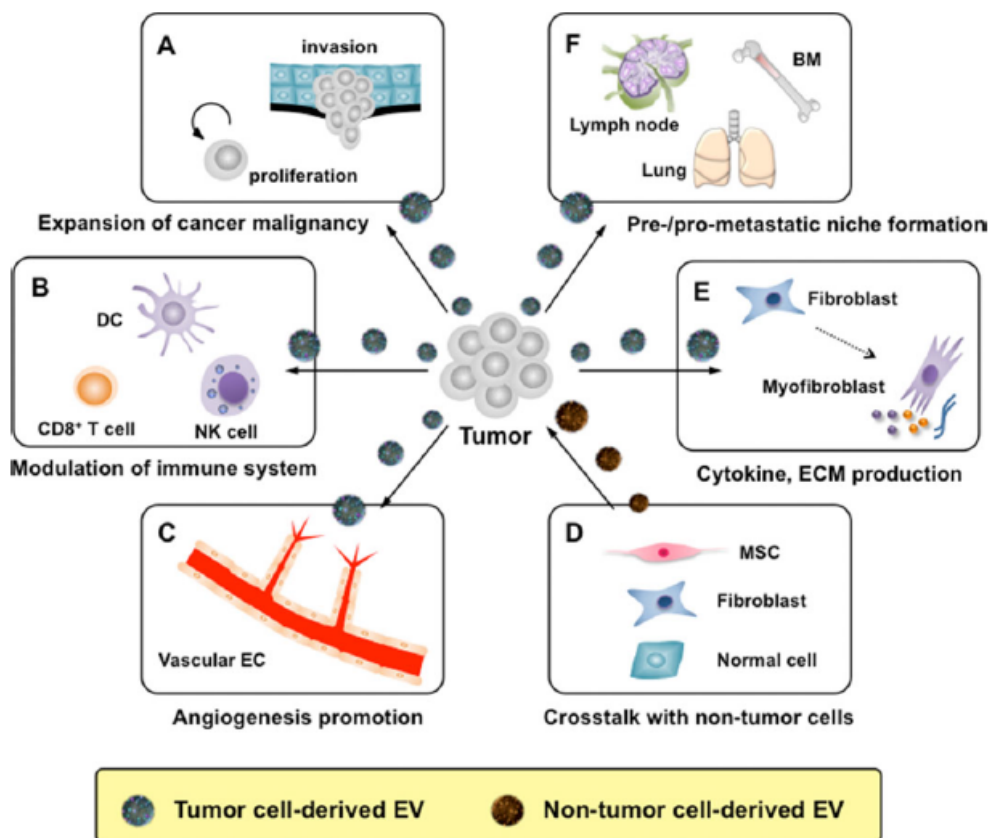


Figura 19. Procesos pro-tumorales en los que participan las EVs. Estas EVs pueden provenir tanto de células cancerígenas como de células del estroma tumoral^[140].

1.4.4 Las EVs en la patogenia del colangiocarcinoma

Se ha puesto de manifiesto recientemente que las EVs secretadas por las células de CCA pueden favorecer su progresión a través de la regulación de las células del estroma, entre las que se encuentran los fibroblastos, macrófagos y linfocitos, entre otras. Así, las EVs secretadas por células de CCA pueden activar a los fibroblastos mesenquimales para que produzcan citoquinas pro-inflamatorias tales como *interleukin-6* (IL6), *chemokine (C-X-C motif) ligand 1* (CXCL1) y la *C-C motif chemokine ligand 2* (CCL2) que a su vez promueven la proliferación y migración de las células tumorales^[127]. Asimismo, las EVs de CCA reducen el número de células citotóxicas *natural killer* positivas para CD3, CD8 y CD56 y la producción de las citoquinas *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) y perforina^[141]. Estos efectos pro-tumorales inducidos por las EVs pueden estar causados por diversas proteínas oncogénicas contenidas en ellas. En este sentido, se ha comprobado que las EVs secretadas por células de CCA (aisladas de pacientes con CCA infectados con *O. viverrini*) contienen diversas proteínas pro-oncogénicas tales como *galectin-3 binding protein* (LGBP), *large neutral amino acids transporter small subunit 1* (LAT1), *4F2 cell-surface antigen heavy chain* (4F2hc), *pyruvate kinase* (KPYM) y *epithelial cell adhesion molecule* (EPCAM)^[142], promoviendo la proliferación de las células de CCA^[143].

1.4.5 Valor diagnóstico y terapéutico de las EVs en cáncer

Valor diagnóstico de las EVs

Las propiedades bioquímicas de las VE las convierten en excelentes candidatos para la búsqueda de nuevos biomarcadores para diversas patologías incluyendo el cáncer. Tal y como se ha comentado anteriormente, estas vesículas están compuestas de diversas biomoléculas (proteínas, RNAs, DNA, metabolitos, lípidos) que pueden variar de manera específica en respuesta a diferentes condiciones celulares. En este sentido, se han identificado diversos miRNAs con posible papel diagnóstico para el CCA. Así, se ha descrito un panel de miRNAs diferencialmente expresados en EVs de

bilis de pacientes con CCA en comparación con pacientes de PSC y pacientes con obstrucciones biliares de diversa etiología que presenta una sensibilidad del 67% y una especificidad del 90% para el diagnóstico diferencial^[144]. Por otro lado, se ha señalado que los pacientes con HCC o CCA presentan un aumento en la concentración de EVs en suero en comparación con pacientes cirróticos, hepatitis C y estenosis biliar no maligna con valor diagnóstico positivo^[145-147]. Asimismo, se ha observado en un estudio piloto un aumento en la concentración de EVs en bilis de pacientes con CCA en comparación con pacientes con estenosis biliar no maligna con valor diagnóstico^[147]. Finalmente, se ha comprobado que los pacientes con HCC o CCA presentan un aumento de concentración de EVs en suero con marcadores positivos para AnnexinV, EPCAM y ASGPR1 en comparación con pacientes con cirrosis hepática, sugiriendo el valor del análisis de estas EVs para el diagnóstico precoz de cáncer de hígado en pacientes con cirrosis^[145].

Valor terapéutico de la regulación de las EVs en cáncer

Los distintos procesos patológicos del cáncer en los que están involucrados las EVs abren nuevas oportunidades terapéuticas. Así, se está poniendo especial atención en la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la biogénesis y secreción de las EVs.

La producción de EVs está regulada por diversas proteínas tales como ESCRT-0/1, *hepatocyte growth factor tyrosine kinase substrate* (HRS), *signal transduction adaptor molecule 1* (STAM1), proteínas de la familia Rab27 y sus proteínas efectoras, *Ras homolog family member A* (RhoA) y *ADP-ribosylation factor 6* (Arf6), entre otras, por lo que su inhibición puede resultar en la disminución de su producción y en cambios en su contenido. Así, se ha comprobado que la inhibición de Rab27a reduce el crecimiento y diseminación de células de cáncer de mama y melanoma^[135, 148]. También se han descrito diferentes estímulos que inducen la producción de EVs, como la elevación de la concentración de Ca²⁺ intercelular, así, tratamientos con dimetil

amilorida (DMA), inhibidor de la bomba sodio/calcio, inhibe la producción de exosomas por las células de linfoma impidiendo de este modo la inhibición que ejercen estas vesículas sobre los linfocitos T. La DMA, además, acentúa el efecto antitumoral del agente quimioterápico ciclofosfamida en tres modelos tumorales en ratón^[136, 149].

Además, se ha propuesto como terapia anticancerígena la eliminación de las EVs del suero mediante diálisis con una matriz de anticuerpos y lectinas para capturar las vesículas^[150], así como estrategias de bloqueo de captación de EVs tumorales por parte de otras células^[151, 152].

Sin embargo, las EVs también pueden ser utilizadas para favorecer la respuesta inmune frente al cáncer y para transportar biomoléculas con efectos terapéuticos. Varios ensayos clínicos de fase I y II han comprobado que células dendríticas expuestas a EVs de células cancerosas son capaces de activar la respuesta antitumoral de los linfocitos T favoreciendo un efecto terapéutico y mínimos efectos adversos^[153, 154]. Por otro lado, EVs derivadas de fibroblastos y que sobre-expresan experimentalmente el miR-195 son capaces de reducir el crecimiento del CCA en modelos experimentales *in vivo*^[139]. Finalmente, las EVs pueden ser utilizadas como vehículos de drogas convencionales para mejorar su selectividad y biodisponibilidad^[155].

Hipótesis y objetivos

Hipótesis y objetivos

La hipótesis central de este estudio se basa en que las EVs presentes en suero pueden contener biomarcadores proteicos con capacidad diagnóstica para la colangitis esclerosante primaria (PSC), colangiocarcinoma (CCA) y carcinoma hepatocelular (HCC). Además, las EVs secretadas por células de CCA podrían contener alteraciones en el patrón proteico capaces de favorecer el crecimiento de estos tumores. Por ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- I. Aislamiento y caracterización de EVs de suero humano, así como de EVs derivadas de cultivos de colangiocitos humanos normales y células de CCA.
- II. Estudio del contenido proteico de EVs presentes en suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos, así como en EVs secretadas por colangiocitos humanos normales y tumorales en cultivo, mediante espectrometría de masas.
- III. Determinación del valor diagnóstico de los biomarcadores proteicos diferencialmente expresados en PSC, CCA o HCC vs controles sanos, CCA vs PSC, y iCCA vs HCC.
- IV. Estudio bioinformático de la función de las proteínas enriquecidas en EVs derivadas de células de CCA en comparación con las EVs secretadas por colangiocitos humanos normales, así como de su papel en la proliferación y migración celular.
- V. Análisis de la presencia en suero de EVs secretadas por tumores de CCA ortotópicos en modelos experimentales *in vivo*.

Material y métodos

Materiales y métodos

M.1 Pacientes

La búsqueda de biomarcadores proteicos en vesículas extracelulares (EVs) se realizó en muestras de suero de pacientes con colangitis esclerosante primaria (PSC; n=30), colangiocarcinoma (CCA; n=43), carcinoma hepatocelular (HCC; n=29) e individuos sanos (Control; n=32) obtenidos del Hospital Universitario Donostia (San Sebastián, España), Hospital de Cruces (Bilbao, España) y del Hospital Médico Universitario de Varsovia (Varsovia, Polonia). Los protocolos de la investigación fueron aprobados por los Comités de Ética para la Investigación Clínica (CEIC) de los respectivos hospitales y todos los pacientes firmaron un consentimiento informado que autoriza el uso de sus muestras para este estudio de investigación biomédica. La Tabla M1 resume diversas características demográficas y clínicas relevantes de los pacientes incluidos en el estudio.

Los pacientes con PSC fueron diagnosticados por la presencia de constricciones e irregularidades típicas en los conductos biliares intra- y extrahepáticos mediante colangiografía por resonancia magnética, tras descartar causas secundarias de colangitis. Todos los pacientes de PSC cumplieron los criterios de diagnóstico recomendados por la Asociación Europea para el Estudio del Hígado (*European Association for the Study of the Liver, EASL*)^[156]. El diagnóstico de CCA y HCC se realizó mediante la combinación de información clínica, bioquímica, radiológica y, cuando fue posible, mediante el análisis histológico de las muestras tumorales. El estadio tumoral se determinó siguiendo las pautas recomendadas por la clasificación de la *7th edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC)*^[157].

Tabla M1. Demographic and clinical information

		Cohort #1			Cohort #2			
		CCA	PSC	Healthy control	CCA	PSC	HCC	Healthy control
Patients (n)		13	9	10	30	21	29	22
Age, mean/range (years)		67.46/60-79	44.33/16-74	49/26-72	66/46-83	30.33/19-50	58.48/36-77	61.41/51-69
Sex, M/F (n/n)		9/4	8/1	4/6	18/12	16/5	3/27	12/10
Bilirubin, mean/range (mg/dL)		2.48/ 0.3-16.7	1.18/ 0.5-3.2	0.67/ 4-13	4.25/ 0.2-22.4	3.143/ 0.3-20.12	NA	0.73/ 0.7-0.8
ALP mean/range (mg/dL)		317.7/ 68-699	295/ 54-630	70/ 52-95	336.9/ 78-1037	357/ 79-1068	NA	55.33/ 49-67
CA19-9, mean/range (U/mL)		2304/ 1.8-22251	10.59/ 1.9-46.8	10.4/ 1.5-38.5	1792/ 2.4-18725	432.6/ 2.31-7970	NA	9.57/ <1-33.4
AFP, mean/range (U/mL)		NA	NA	2.69/ 1.2-5.6	NA	NA	2501/ 1-73570	2.6/ <1-10
CCA type	iCCA	5			8			
	pCCA	5			6			
	dCCA	3			16			
PSC type	PSC-UC		6			17		
	PSC-Crohn		1			0		
	PSC-IBD (non specified)		0			1		
	PSC without IBD		2			3		

Abreviaturas: iCCA, CCA intrahepático; pCCA, CCA perihilar; dCCA, CCA distal; AFP, alfa fetoproteína; ALP, fosfatasa alcalina; CA19-9, antígeno carbohidrato 19-9; CEA, antígeno carcinoembrionario; ID, identificación; PSC-UC, colitis ulcerosa (UC) y PSC concomitante; PSC-Crohn, enfermedad de Crohn y PSC concomitante; ND: no disponible.

M.2 Cultivos celulares

Se utilizaron colangiocitos humanos normales (NHC, del inglés *normal human cholangiocytes*) e inmortalizados con el virus oncogénico SV-40 (i.e. H69), así como dos tipos celulares de CCA humano (i.e. EGI1 y TFK1) en cultivo. Los NHC fueron aislados de tejido hepático normal y caracterizados extensamente tal y como hemos descrito previamente[158-160]. Los colangiocitos humanos inmortalizados con SV-40 (i.e. H69) fueron cedidos amablemente por el Dr. Jefferson (Tufts University, Boston, MA). Por otro lado, las células de CCA (i.e. EGI1 y TFK1) fueron obtenidas comercialmente del *Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures* (Alemania). Tanto las células EGI1 como las TFK1 fueron aisladas de tumores extra-hepáticos de pacientes con CCA.

El cultivo de todos los tipos celulares se realizó en frascos o placas de plástico (Gibco, EEUU), las cuales se recubrieron con una fina capa de colágeno para mejorar

la adhesión y crecimiento celular. La solución de colágeno se preparó en agua destilada con ácido acético al 0,1% y a una concentración de 50 mg/L a partir de una solución de colágeno de cola de rata tipo I (BD Biosciences, EEUU). Una vez preparada la solución ésta se filtró con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro (Corning, EEUU) para asegurar su esterilidad. La colagenización de los frascos/placas de cultivo se realizó mediante la incubaron de éstas con la solución de colágeno durante un mínimo de una hora, tras la que se retiró la solución y se lavaron los frascos/placas con una solución tampón fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS) y se dejaron secar para su posterior utilización. Las células NHC, H69 y EG11 se crecieron en un medio enriquecido llamado “Flask” tal y como hemos descrito previamente^[160] (Tabla M2). Por otro lado, las células de CCA TFK1 no crecen adecuadamente en medio Flask por lo que se cultivaron en medio DMEM/F12+Glutamax suplementado con *fetal bovine serum* (FBS) al 10% y *penicillin/streptomycin* (P/S) al 1%. Durante los diferentes estudios se comprobó que todas las células estuviesen libres de contaminación por micoplasma (*Vernor GeM*, *Mycoplasma detection kit, PCR based*, Sigma-Aldrich).

Tabla M2. Medio de cultivo “Flask”				
Reactivo	Concentración	Medio Apical	Medio Basolateral	Compañía
<i>DMEM/F12+Glutamax</i>	89% (v/v)	X	X	Gibco, EEUU
<i>Fetal bovine serum</i>	5% (v/v)			Gibco, EEUU
<i>Non-essential aminoacids</i>	1% (v/v)	X	X	Gibco, EEUU
<i>Lipid mixture 1000X</i>	0,1% (v/v)	X	X	Sigma-Aldrich, EEUU

<i>Vitamin solution</i>	1% (v/v)	X	X	Gibco, EEUU
<i>Penicillin/Streptomycin</i>	1% (v/v)	X	X	Gibco, EEUU
<i>Soybean trypsin inhibitor</i>	0,05 mg/mL	X	X	Gibco, EEUU
<i>Insulin</i>	1% (v/v)	X		Gibco, EEUU
<i>Bovine pituitary extract</i>	30 µg/mL			Gibco, EEUU
<i>Dexamethasone</i>	393 ng/mL		X	Sigma-Aldrich, EEUU
T3 (3,3' 5-triiodo-L-thyronine)	3,4 µg/mL		X	Sigma-Aldrich, EEUU
<i>Epidermal growth factor (EGF)</i>	25 ng/mL			Gibco, EEUU
<i>Forskolin</i>	4,11 mg/mL			Abcam, Reino Unido

M. 3 Modelos animales

M.3.1 Modelo murino de CCA orto-tópico

Con el objetivo de investigar la posible identificación en suero de proteínas presentes en EVs de origen tumoral, se realizó un modelo experimental de CCA humano orto-tópico implantado en ratones inmunodeficientes.

Para generar dicho modelo experimental, en primer lugar, se inyectaron 500.000 células de CCA humano (EG11) subcutáneamente en la espalda de ratones inmunodeficientes Crl:CD1-Foxn1^{nu} (Charles River, EEUU) macho de ocho semanas de edad. Estas células se dejaron crecer durante un mes formando tumores que fueron extirpados, cortados en trozos pequeños (~0,25 cm) e implantados en el hígado de otro grupo de ratones inmunodeficientes del mismo tipo y edad (n=16). Como controles se incluyó un grupo de ratones operados, pero a los que no se les realizó el

implante tumoral (n=14). El crecimiento de los tumores orto-tópicos se monitorizó en el momento de la implantación, al mes y a los dos meses post-implantación, mediante resonancia magnética nuclear (MRI). Tras los dos meses de crecimiento, y una vez comprobado que la masa tumoral había crecido significativamente en los hígados, se extrajo 1 mL de sangre periférica que se dejó coagular a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente se aisló el suero mediante su centrifugación a 1500xg durante 20 minutos. Las muestras de suero fueron congeladas a -80°C para el posterior aislamiento de las EVs. Posteriormente, se aislaron las EVs de dichos sueros (c.f. protocolo de aislamiento de EVs más abajo) y se analizó su contenido proteico mediante espectrometría de masas, tratando de identificar proteínas de origen humano única y específicamente presentes en los ratones con implantes orto-tópicos de tumores de CCA humano. Este protocolo experimental fue aprobado por el Comité Ético para Investigación Animal del Instituto de Investigación Sanitaria Biodonostia (San Sebastián, España).

M.4 Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares (EVs)

M.4.1 Aislamiento de EVs

El aislamiento de EVs tanto de suero como de sobrenadante de cultivos celulares se llevó a cabo mediante un protocolo basado en centrifugaciones, ultracentrifugaciones y filtraciones seriadas^[161] (Fig. M1).

Para el aislamiento de EVs de suero la sangre extraída se dejó coagular a temperatura ambiente durante 20 minutos y posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 1500xg durante 20 minutos a 4°C. El suero resultante se filtró a través de unidades de filtración para jeringa de 0,22 µm (Merck Millipore, Alemania) para quitar desechos celulares y EVs de gran tamaño. A continuación, las muestras de suero se alicuotaron en volúmenes de 1 mL y se guardaron a -80°C para continuar

posteriormente con su procesamiento. El aislamiento de EVs se realizó a partir de 1 mL de suero, tal y como se detalla posteriormente.

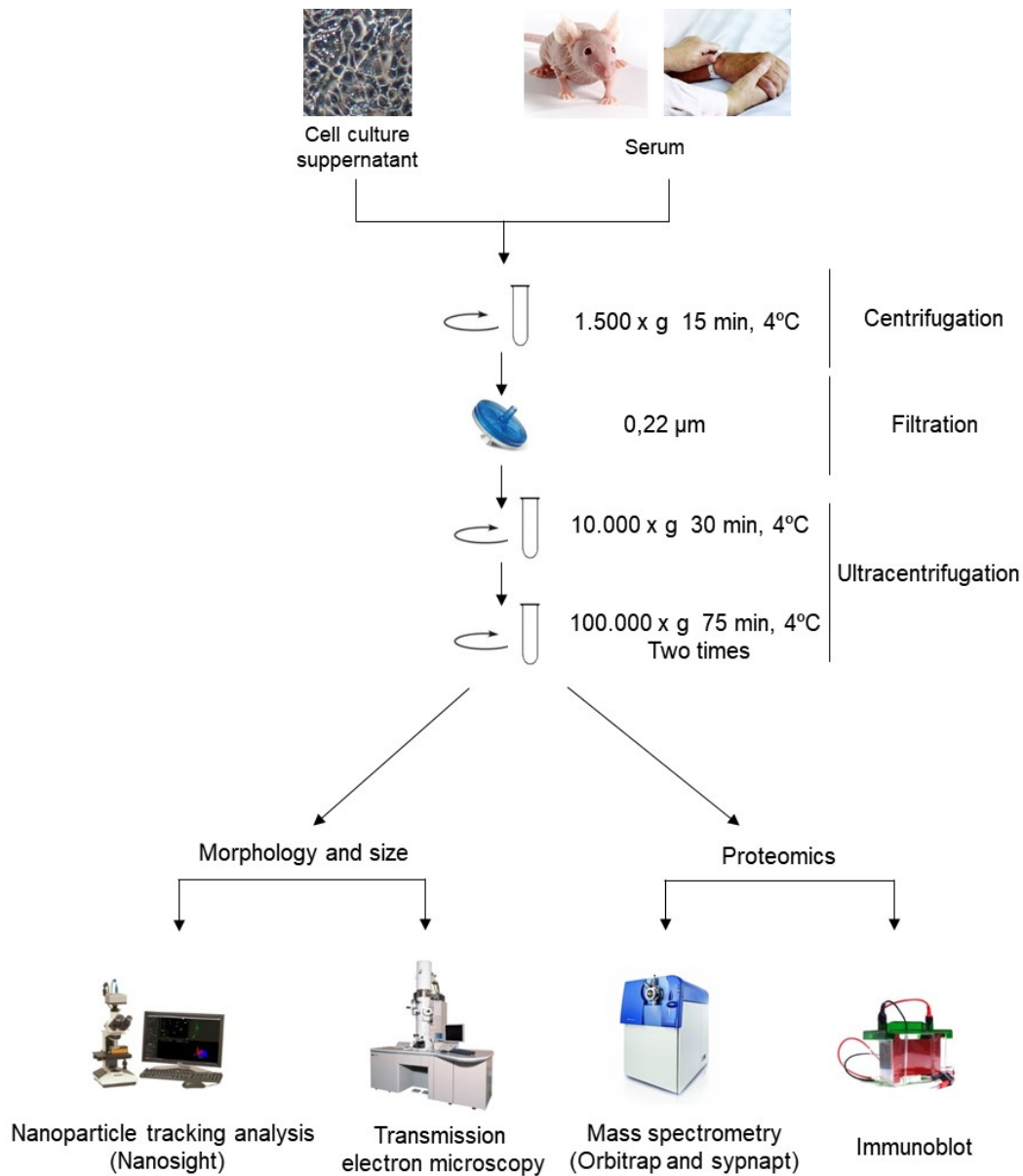


Figura M1. Protocolo de aislamiento y caracterización de EVs de suero y sobrenadante de cultivos celulares.

Por otro lado, el aislamiento de EVs de cultivos celulares se realizó a partir del sobrenadante celular. Para ello, 4×10^6 células (i.e. NHC, H69, EGI1 y TFK1) se sembraron en placas de 150 mm de diámetro con medio DMEM/F12+Glumatax suplementado con 10% FBS y 1% P/S, las cuales se dejaron adherir a las placas

durante toda la noche. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por medio de recolección (DMEM/F12+Glutamax, sin suero y suplementado con 1% P/S), el cual se incubó durante 48 horas.

Además, puesto que los colangiocitos en condiciones fisiológicas son células epiteliales polarizadas que presentan dominios apicales y basolaterales de membrana, se procedió a su polarización en cultivo^[162] y al aislamiento diferencial de EVs de los dominios apical y basolateral. Para ello, 1×10^6 células NHC, EGI1 y TFK1 fueron sembradas en placas *transwell* de 100 mm con un diámetro de poro de $0,4 \mu\text{m}$ (Corning, EEUU) con medio de cultivo Flask durante 24 horas para una apropiada adhesión. Transcurrido este tiempo, se cambió el medio a un medio específico diferencial “apical” vs “basolateral” (Tabla M2) que favorece la polarización de los colangiocitos^[162, 163]. En estas condiciones se dejaron las células durante 4 días, tras los cuales se recolectó el medio de cultivo para el posterior aislamiento de las EVs.

Una vez transcurrido el tiempo de recolección en las diferentes condiciones experimentales *in vitro*, se recogió el medio de cultivo y se centrifugó a $1500 \times g$ 15 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtró ($0,22 \mu\text{m}$ de diámetro de poro; Corning, EEUU) con el objetivo de quitar células muertas, desechos celulares, cuerpos apoptóticos y EVs de gran tamaño. Este procesamiento se realizó a 4°C . Finalmente, se guardaron las muestras a -80°C para el posterior aislamiento de EVs.

El aislamiento de EVs, tanto de suero como de sobrenadante de cultivos celulares, se llevó a cabo siguiendo un protocolo bien establecido basado en centrifugaciones, ultracentrifugaciones y filtraciones seriadas^[161] resumido en la Fig. M1. En primer lugar, las muestras fueron descongeladas. En el caso de las muestras de suero, éstas fueron diluidas un tercio con PBS con el objetivo de reducir su densidad. A continuación, las muestras fueron centrifugadas a $10.000 \times g$ durante 30 minutos para quitar desechos celulares pequeños y otras EVs de gran tamaño remanentes. Posteriormente, se

procedió a la recogida de EVs de pequeño tamaño mediante una ultracentrifugación a 100.000xg durante 75 minutos. Después, se desechó el sobrenadante y se lavaron las EVs con PBS para su posterior centrifugación a 100.000xg durante 75 minutos. Finalmente, se descartó el sobrenadante y las EVs se resuspendieron en 20 μ L de PBS para las muestras de suero (concentración 50 veces superior a la original) o en 50 μ L para las EVs provenientes de medio de cultivo celular (concentración 5.000 veces superior a la original). Las EVs resultantes fueron congeladas a -80°C para su posterior utilización.

M.4.2 Microscopía electrónica de transmisión

La morfología y tamaño aproximado de las EVs se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, en inglés, *transmission electron microscopy*) en muestras criogenizadas (crio-microscopía electrónica) en el CICbioGUNE (Derio, España). Para ello, las EVs se adsorbieron directamente en rejillas de carbono con poros (QUANTIFOIL, Alemania) que se dejaron secar y posteriormente fueron introducidas en etano líquido con la ayuda del VITROBOT (Maastricht Instruments BV, Países Bajos). Las imágenes de TEM se obtuvieron de muestras vitrificadas a temperatura de nitrógeno líquido (-195°C) con un crio-microscopio electrónico de transmisión JEM-2200FS/CR (JEOL, Japón) equipado con un cañón de emisión de electrones a un voltaje de aceleración de 20 kV.

M.4.3 Nanoparticle tracking analysis (NTA)

La caracterización del tamaño y concentración de las EVs en las distintas muestras se realizó mediante NTA utilizando un aparato *NanoSight LM10* (Malvern, Reino Unido) equipado con una cámara de video de captura rápida y un programa informático para el seguimiento de las nanopartículas. Esta tecnología se basa en la medición del movimiento browniano de las EVs con el que se determina su tamaño y en la cuantificación directa de las vesículas por conteo directo^[164]. La visualización de las EVs se lleva a cabo mediante la dispersión de luz generada por estas nanopartículas

al paso de un láser. Se mantuvieron los ajustes del NTA recomendados por la compañía en todas las mediciones realizadas para las diferentes muestras.

M.4.4 Immunoblot

Tanto la presencia de marcadores proteicos típicos de EVs, tales como CD9, CD81 y CD63 en las EVs aisladas de suero y de sobrenadante de cultivos celulares como la determinación de la abundancia de los biomarcadores proteicos en las EVs de suero fue evaluada mediante *immunoblot*. En el caso de las EVs derivadas de suero la expresión de los marcadores de EVs fue comparada con su expresión en el extracto celular total (WCE, en inglés *whole cell extract*) de células NHC y en el caso de las EVs derivadas de los cultivos celulares con los WCE de las células parentales (10 µg de proteína en todos los casos). Como control negativo se evaluó la presencia de la proteína *78 kDa glucose-regulated protein homolog (GRP78)*, la cual está presente únicamente en el retículo endoplasmático y no se secreta en EVs. Para la determinación de la abundancia de los biomarcadores proteicos se compararon muestras de EVs de suero con el suero total (10 µg de proteína en ambos casos).

La concentración de proteína fue determinada mediante el kit *micro BCA protein assay kit* (Thermo Scientific, EEUU). Tanto las proteínas de EVs como las de los extractos celulares totales se aislaron y desnaturalizaron en condiciones no reductoras para mantener la integridad de los puentes disulfuro con el tampón 50 mM Tris-Cl, 2% sodio dodecil sulfato (SDS), 10% glicerol and 0.1% azul de bromofenol sin β-mercaptoetanol o ditioneitol (DTT), ambos agentes reductores, y con desnaturalización térmica en tres pasos de 37°C, 65°C y 95°C de 5 minutos cada uno. Los extractos proteicos se corrieron en un gel de poliacrilamida-SDS al 12,5% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare, EEUU). A continuación, se bloquearon los sitios inespecíficos de unión de las membranas durante 1 hora con una solución de bloqueo [5% de leche desnatada en polvo disuelta en PBS en presencia del detergente tween-20 (Sigma-Aldrich, EEUU) al 0,1%] a temperatura ambiente (TA).

Posteriormente, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario apropiado (Tabla M3) disuelto en solución de bloqueo durante toda la noche y refrigeradas a 4°C. Al día siguiente, se procedió al lavado de las membranas en tres pasos de 5 minutos con PBS-0.1% tween-20 para proceder a la incubación del anticuerpo secundario unido a peroxidasa durante 1 hora a TA en solución de boqueo a una dilución 1:5.000. Por último, la visualización de las proteínas se realizó mediante el reactivo *enhanced chemoluminescence* (Thermo Scientific, EEUU) que produce luminiscencia al ser transformado por la peroxidasa unida al anticuerpo secundario. Esa luminiscencia producida fue capturada mediante películas fotográficas (GE Healthcare, EEUU).

M.4.5 Inmunofluorescencia

La distribución y expresión del marcador de EVs CD63 se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia en células NHC, H69, EGI1 y TFK1, que fueron cultivadas en cubreobjetos de cristal (Thermo Scientific, EEUU) colagenizados (c.f. sección de cultivo celular para información relativa al proceso de colagenización) en placas de cultivo de 24 pocillos. Una vez que las células se encontraban totalmente adheridas a los cubreobjetos, estos se fijaron con 1 mL de metanol [Panreac (Illinois Tool Works), EEUU] durante 15 minutos a -20°C. Después, las células se lavaros tres veces con PBS y fueron permeabilizadas durante 30 minutos con PBS al 0,5% de tween-20 a TA. Posteriormente, las células se incubaron 30 minutos a TA con solución de bloqueo [PBS al 0.5% de Tritón X-100 + 0.1% albúmina de suero bovino (BSA, en inglés *bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich, USA)] y, a continuación, con dicha solución incluyendo el anticuerpo anti-CD63 a una concentración 1:100 en PBS al 0,5% Triton X-100 y 1% BSA durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las células se lavaron tres veces con PBS+1% BSA y se incubaron 1 hora a TA con el anticuerpo secundario fluorescente apropiado en la misma solución usada para los lavados. Por último, se realizaron otros 3 lavados con PBS, se recogieron los cubreobjetos con las células y se les añadió una gota de medio de montaje con DAPI para el marcaje fluorescente de

los núcleos celulares VECTASHIELD™ (Vector Laboratories, EEUU). Las imágenes se capturaron a través de un microscopio de fluorescencia (Eclipse 80i) equipado con una cámara Nikon Digital Sight y el programa informático NIS-elements AR 3.2 (Nikon, Japón).

Tabla M3. Anticuerpos primarios y secundarios				
Anticuerpo	Especie de origen	Compañía	Cepa	Dilución
Anti-CD81	R	BD Biosciences	JS-81	WB: 1:1000
Anti-CD9	R	Santa Cruz Biotechnology	C-4	WB: 1:1000
Anti-CD63	CO	DSHB	H5C6	WB: 1:500 IF: 1:50
Anti-GRP78	R	BD Biosciences	—	WB: 1:1000
Anti-PIGR	CO	Abcam (ab96196)	—	WB: 1:500
Anti-AMPN/CD13	CO	Abcam (ab108382)	EPR4059	WB: 1:500
Anti-CRP	R	Abcam (ab50861)	26D7	WB: 1:500
Anti-rabbit IgG-HRP	C	Cell signaling	—	WB: 1:5000
Anti-mouse IgG-HRP	—	Cell signaling	—	WB: 1:5000
Anti-mouse IgG-Alexa fluor 568	B	Thermo Scientific	—	IF: 1:1000

Abreviaturas: B, burro; C, cabra; CO, conejo; IF: inmunofluorescencia; R, ratón; WB, *western blot* (*immunobot*).

M.5 Análisis proteómico

M.5.1 Extracción proteica y preparación de muestra asistida por filtro

Las EVs fueron digeridas con un “tampón de digestión” compuesto por 4% de SDS, 0,5M de bicarbonato de trietilamina (BTEA) y 100 mM de DTT. A continuación, se añadió el mismo volumen de una solución al 8% SDS, 1M BTEA y 200 mM de DTT, y se procedió a la realización de 3 pulsos de 30 segundos de agitación mediante “vortex” seguidos de 10 minutos de incubación. Posteriormente, se realizó la preparación de muestra asistida por filtro (FASP, en inglés *filter aided sample preparation*) tal y como se ha descrito previamente^[165]. Este procedimiento se basa en la utilización de unidades de filtración estándares que permiten el intercambio del tampón y que funciona como un reactor para la digestión. A cada paso de digestión le siguió una centrifugación de 20 minutos a 13.000 revoluciones por minuto (rpm) para eliminar el tampón remanente en el filtro. Las muestras fueron cargadas en unidades de centrifugación *Amicon Ultra 0.5 ml 30K* (Merck Millipore, Alemania), lavadas dos veces en solución UA (8 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8.5) y alquiladas mediante solución UA con 50 mM iodoacetamida durante 20 minutos. Posteriormente, se realizaron tres lavados con la solución UA seguidos de otros tres lavados en 50 mM de amonio bicarbonato. Se cuantificó la cantidad de proteína mediante el ensayo de cuantificación de proteína de Bio-Rad (Bio-Rad, EEUU) y se añadió tripsina en proporción 1:10 a la muestra. La mezcla se incubó toda la noche a 37°C y, al día siguiente, los péptidos fueron rescatados de las unidades de filtración y sujetos a extracción mediante acetato de etilo siguiendo el protocolo descrito por Yeung y Stanley^[166]. Brevemente, se añadió a la solución peptídica acetato de etilo saturado con agua y se agitó vigorosamente mediante “vortex” durante 1 minuto. Después, se centrifugaron las muestras a 13.000 rpm durante 15 segundos y se extrajo la capa superficial de acetato de etilo, repitiendo el proceso 5 veces. Una vez terminadas las centrifugaciones se descartó con cuidado el acetato de etilo y las muestras fueron aspiradas en un *RVC2 25 speedvac*

concentrator (Martin Christ, Alemania). Los péptidos *zip-tip* se resuspendieron en ácido fórmico al 0,1% previamente al análisis en el espectrómetro de masas (MS, del inglés *mass spectrometry*).

M.5.2 Análisis por espectrometría de masas

La preparación de los péptidos se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido de alto rendimiento (UPLC, del inglés *ultra high performance liquid chromatography*) *nanoACQUITY* (Waters, EEUU) conectado a los espectrómetros de masas *LTQ Orbitrap XL* (Thermo Scientific, EEUU) y *Synapt G2 Si* (Waters, EEUU). Una alícuota de cada muestra se cargó en una columna cromatográfica *Symmetry 300 C18 UPLC Trap column* (180 μm x 20 mm, 5 μm) (Waters, EEUU). La pre-columna fue conectada a otra columna *BEH130 C18 column* (75 μm x 200 mm, 1.7 μm) (Waters, EEUU) y equilibrada en solución al 3% de acetonitrilo y 0,1% de ácido fórmico. Los péptidos fueron eluidos directamente en un capilar de *nano-electrospray* (Proxeon Biosystems, Dinamarca) a un flujo de 300 nL/min, usando un gradiente lineal de acetonitrilo entre 3-50%. El *LTQ Orbitrap XL ETD* hace automáticamente el cambio de adquisición entre ME y ME/ME en el modo DDA. El espectro total de ME (m/z 400-2000) se adquirió en el *Orbitrap* con una resolución de masa de 30.000 a m/z 400. Después de cada medición, los seis iones más intensos después de más de 1000 lecturas fueron sujetos a disociación sujeta a colisión (DSC) en la trampa iónica lineal. Precursores con estados de carga de 2 y 3 fueron específicamente seleccionados para la DSC. Los péptidos fueron excluidos para análisis posteriores durante 60 segundos usando la característica de exclusión dinámica. El espectrómetro *Synapt G2Si ESI Q-Mobility-TOF* (Waters, EEUU) equipado con una cámara de movilidad iónica (T-Wave-IMS) operó en modo positivo ESI. La masa de los péptidos fue corregida después de la adquisición usando un ion [Glu1]-Fibrinopeptido B mono-isotrópico con doble carga. Los datos de la cromatografía líquida-EM se recogieron en modo HDDA que aumenta la intensidad de las señales usando un paso de separación de la movilidad iónica.

M.5.3 Bases de datos

La identificación de los péptidos fue realizada usando el programa informático *Mascot search engine v2.1* (Matrix Science Ltd., Reino Unido). Las búsquedas del *LTD Orbitrap XL ETD* se realizaron usando el programa *Proteome Discoverer 1.4*. (Thermo Scientific, EEUU). La carbometilación de las cisteínas se determinó como modificación fija y la oxidación de las metioninas como variable. Se permitió una tolerancia a la masa de los péptidos de 10 partes por millón (ppm), una tolerancia de 0,5 Da a la masa de los fragmentos y 2 cortes. Los espectros se buscaron en la base de datos *Uniprot/Swissprot* versión 2013_07. Para estimar la proporción de descubrimientos falsos (FDR, en inglés *false discovery rate*) se realizó una búsqueda por señuelo. Sólo se consideraron péptidos con un FDR menor del 1%. Las búsquedas del *Synapt G2S* se realizaron usando los mismos parámetros utilizados para el *Orbitrap* exceptuando la tolerancia de la masa peptídica, que fue de 15 ppm en vez de 10 ppm y la tolerancia de la masa de los fragmentos de 0,2 Da en vez de 0,5 Da.

M.5.4 Análisis mediante progenesis

El análisis de la expresión diferencial de las proteínas se realizó utilizando el programa informático *Progenesis LC-MS*, versión 4.0.4265.42984 (Nonlinear Dynamics, Waters, EEUU). Una vez que los archivos crudos fueron importados del *Orbitrap* y *Synapt*, una de las rondas fue utilizada como referencia, a la que se alinearon los precursores de masas de las demás muestras. Solamente se seleccionaron características comprendidas entre 2+ y 3+. Las abundancias crudas de cada característica se normalizaron y logaritizaron automáticamente respecto a la ronda de referencia. Las muestras fueron agrupadas en concordancia con las comparaciones realizadas y analizadas mediante ANOVA. Se consideraron aquellas características con un p valor menor de 0,01 y una proporción mayor de 2 en cualquier dirección. Se generó una lista con los picos que contienen la información de las características estadísticamente significativas y fue exportada al *Mascot search engine*

(Matrix Science Ltd., Reino Unido). Los archivos generados se alinearon con la base de datos *Uniprot/Swissprot* para proteínas humanas bajo las condiciones previamente descritas en la sección de bases de datos. La lista de péptidos identificados fue importada al *Progenesis LC-MS* y se asignaron a las características previamente cuantificadas. Los péptidos no conflictivos, aquellos que alinean con una única proteína, fueron específicamente escogidos para la cuantificación y sólo se seleccionaron aquellas proteínas que al menos presentaban dos péptidos no conflictivos. Se consideraron aquellos cambios de expresión a nivel de proteína que presentaban un cambio estadísticamente significativo (p valor $\leq 0,01$ en análisis ANOVA) y una proporción mayor de 2 en cualquier dirección.

M.5.5 Análisis funcional in silico

Análisis por DAVID: Para determinar los procesos biológicos relacionados con las proteínas diferencialmente expresadas, se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento *gene ontology* (GO) usando el programa DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/summary.jsp>). [167, 168] DAVID es una herramienta de análisis de enriquecimiento y anotación de términos GO que pone de relieve los términos más significativos asociados a una lista de genes determinada. El programa determina a través de un test exacto de Fisher si la proporción de genes asociados a un término GO determinado difiere significativamente entre los datos y con respecto al *background* genético de la especie seleccionada, en este caso humana. Para una selección de resultados más conservadora se aplicó una versión del test de Fisher para corregir los FDR. Se determinaron procesos biológicos (PB), funciones moleculares (FM) y componentes celulares (CC) para las listas de proteínas analizadas y se consideraron aquellos términos GO con un FDR < 5%. Además, también se analizaron vías KEGG considerando términos enriquecidos que tuviesen un p valor < 0,01. El DAVID también proporciona una anotación funcional en conjunto donde anotaciones similares se muestran conjuntas, haciendo que la interpretación

sea más sencilla y los resultados biológicos más claros y enfocados a los procesos enriquecidos más interesantes. Los marcadores de enriquecimiento de los grupos proporcionan una medida geométrica (en $-\log$ de la escala) de los valores estadísticos “p” de los miembros agrupados y se utiliza para hacer la clasificación de la significación biológica.

Análisis por *Ingenuity pathway analysis*: además del análisis funcional proporcionado por DAVID y para tener un análisis más completo de los procesos biológicos en los que participan las proteínas diferencialmente expresadas se utilizó el programa informático *Ingenuity pathway analysis* (IPA, Qiagen N.V., Alemania). Los valores “p” calculados determinan la probabilidad de que la asociación de las proteínas identificadas con una vía señalización determinada una red funcional o que un regulador sea casual. Estos valores “p” se calcularon por medio de un test exacto de Fisher y se consideraron valores “p” menores de 0,05 como significativos. La activación de una determina vía de señalización, representada por el *Z-score* que es una medida del estado de activación (valores positivos) o inactivación (valores negativos) de los reguladores de las vías en base a los conocimientos de las relaciones entre los efectores y sus moléculas diana.

M.5.6 Cálculo de biomarcadores

El cálculo de la sensibilidad y especificidad de los biomarcadores proteicos, y la determinación de su valor diagnóstico se obtuvo utilizando el programa SPSS 20.0 (IBM Ehningen, Alemania). Los valores óptimos de corte para cada marcador se determinaron a través del área debajo de la curva (AUC, en inglés *area under de curve*) de la representación *receiver operating characteristic* (ROC) obtenida de los valores de sensibilidad y especificidad.

M.6 Proliferación celular

Se sembraron 5.000 células NHC en medio de cultivo Flask en cada pocillo de placas de 96 pocillos colagenizadas y se dejaron toda la noche para una correcta

adhesión. A continuación, las células se incubaron con medio DMEM/F-12 suplementado con FBS + P/S al 1% durante 24 horas, tras las cuales se añadió y se incubó durante 48 horas: a) EVs de células EGI1, b) EVs de células EGI1 desnaturalizadas a 95°C durante 10 minutos, o c) EVs de NHC a una concentración de 10 µg/µL (las dos últimas condiciones utilizadas como control negativo).

La proliferación celular se determinó utilizando el *Cell Proliferation WST-1 Assay* (Roche, Suiza). Para ello, una vez puestos los tratamientos y transcurridas 48 horas, se añadió a la placa el reactivo WST-1 a una dilución 1/10, se incubó durante 1 hora a 37°C y los valores de absorbancia del WST-1 fueron determinadas en el espectrofotómetro *Mustiskan Ascent* (Thermo Scientific, EEUU) a una longitud de onda de 450 nm.

M.8 Migración celular

Los estudios de migración celular se realizaron utilizando el procedimiento *scratch-wound assay*^[169]. Para ello, se sembraron NHC 30.000 células en placas de 24 pocillos colagenizadas en medio completo Flask y se dejaron toda noche para una correcta adhesión. Una vez que las células se adhirieron, y tras alcanzar el 100% de confluencia, se cambió el medio de cultivo por DMEM/F-12 suplementado con P/S al 1%. A continuación, se realizaron dos pequeñas rayas por pocillo con una punta de pipeta de 10 µL que dejaron un espacio libre para medir la capacidad celular de invasión/migración en las distintas condiciones experimentales. Las células levantadas como consecuencia del *scratch-wound assay* fueron eliminadas mediante un lavado con PBS. A continuación, se añadieron EVs aisladas de sobrenadante de células EGI1 o TFK1 a una concentración de 10 µg/µL, o PBS como control negativo, y se midió tras 8 horas la superficie relativa libre de células utilizando el programa *ImageJ* (*National Institute of Health*, EEUU). Las imágenes se obtuvieron mediante un microscopio de luz *Nikon Eclipse TS-100* acoplado a una cámara *Nikon D90* (Nikon, Japón). Para una

mejor visualización de las células a tiempo final se fijaron las células con Cristal Violeta (Sigma-Aldrich, EEUU) disuelto en formaldehído al 4%.

M.9 Análisis estadístico

Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante el programa informático *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, EEUU). Los datos se presentan como medias y con su error estándar de la media (SEM, del inglés *standard error of the mean*). Para los análisis comparativos de los datos, primero se realizaron pruebas de normalidad de la distribución de las muestras, incluyendo los test de normalidad D'Agostino-Pearson, Shapiro-Wilks y Kolmogorov-Smirnov. Para los análisis comparativos entre dos grupos se usó el test paramétrico *T-Student* cuando las muestras cumplían una distribución normal y *Mann-Whitney* para muestras con una distribución que no cumplen normalidad. Para comparaciones entre más de dos grupos se utilizó la prueba *one-way analysis of variance* (ANOVA) seguida de la prueba *post hoc* de *Tukey* para muestras que cumplen distribuciones paramétricas y la prueba *Kuskal-Wallis* seguida de la prueba de *Dunns* en el caso de muestras con una distribución no paramétrica. Para los valores de biomarcadores en muestras de pacientes, se utilizó el logaritmo de los valores para que cumplieren una distribución gaussiana, ya que de partida no la presentaban. Todas las comparativas con un valor "p" (*p value*) menor de 0,05 se consideraron significativas.

Resultados

Resultados

R.1 Caracterización de EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos

Las EVs de suero de fueron caracterizadas morfológicamente mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), a través del análisis de expresión de marcadores proteicos por *immunoblot*, y su tamaño y concentración mediante *nanoparticle tracking analysis* (NTA). Las imágenes de TEM mostraron EVs con morfología esférica típica de exosomas y microvesículas de pequeño tamaño y un tamaño en torno a 150-180 nm (Fig. R1A). Mediante *immunoblots* dichas EVs mostraron una elevada abundancia de marcadores proteicos típicos de EVs tales como CD9, CD63 y CD81 en comparación con extracto celular total de colangiocitos humanos normales (NHC) en cultivo (Fig. R1B). En este sentido, tal y como se esperaba, no se apreció presencia de la proteína de retículo endoplasmático *78 kDa glucose-regulated protein* (GRP78) en las EVs aisladas de suero en comparación con su alta abundancia en el extracto celular total de NHC. Todos estos datos indican que el protocolo de aislamiento de las EVs es adecuado, reproducible y específico (Fig. R1B). El análisis por *nanoparticle tracking analysis* (NTA) reveló una ligera disminución en el tamaño (diámetro) de la población más abundante de EVs de suero (moda) en los pacientes con CCA en comparación con los de PSC, sin cambios en las comparativas entre los demás grupos (Fig. R1C). Los diámetros medidos de la moda de las EVs fueron: 177,3 nm en PSC, 157,1 nm en CCA nm, 158,7 nm en HCC y 176,6 nm en controles sanos. En relación con la concentración de EVs en suero, se observó un ligero aumento en su concentración en los pacientes con HCC en comparación con los demás grupos, sin verse diferencias entre las demás comparativas (Fig. R1C). Las concentraciones (partículas/mL) de EVs en el suero fueron: $689,2 \times 10^8$ en PSC, $860,9 \times 10^8$ en CCA, $998,3 \times 10^8$ en HCC y $741,2 \times 10^8$ en individuos sanos.

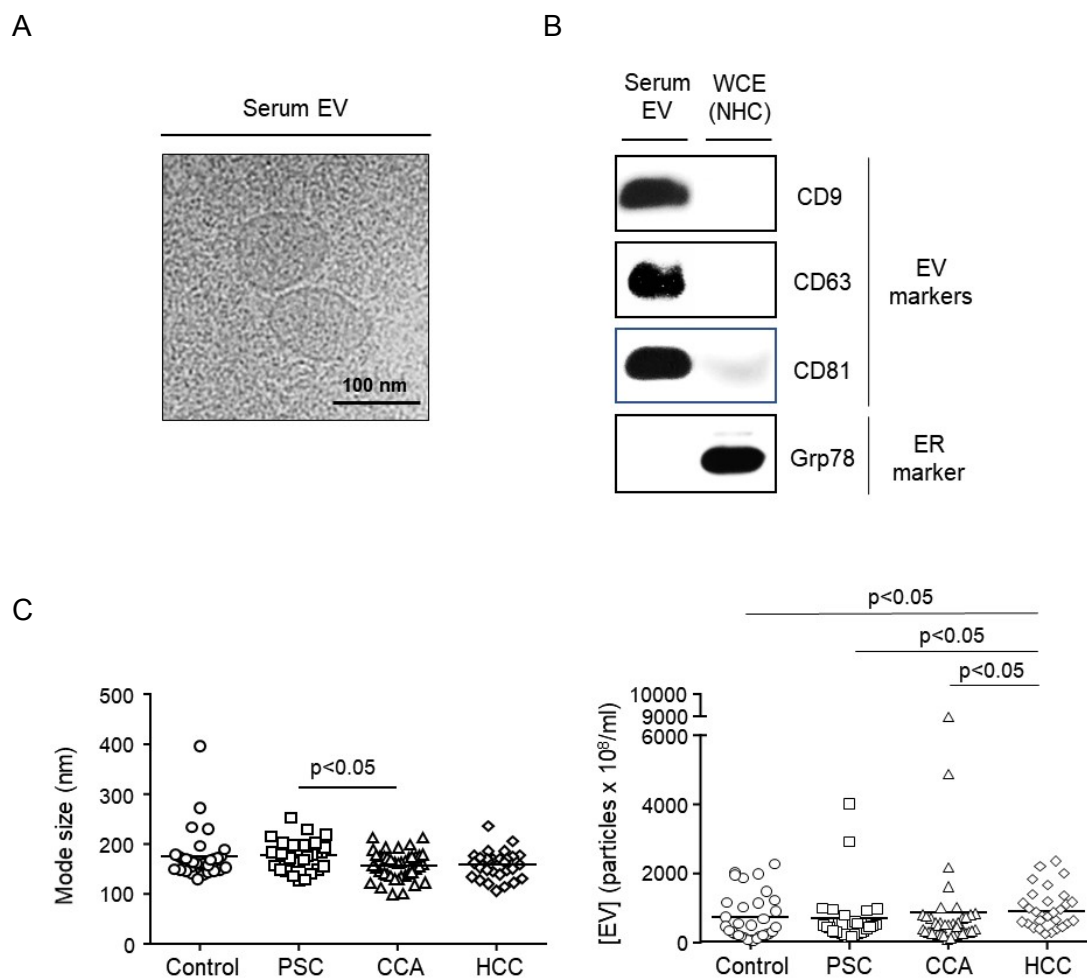


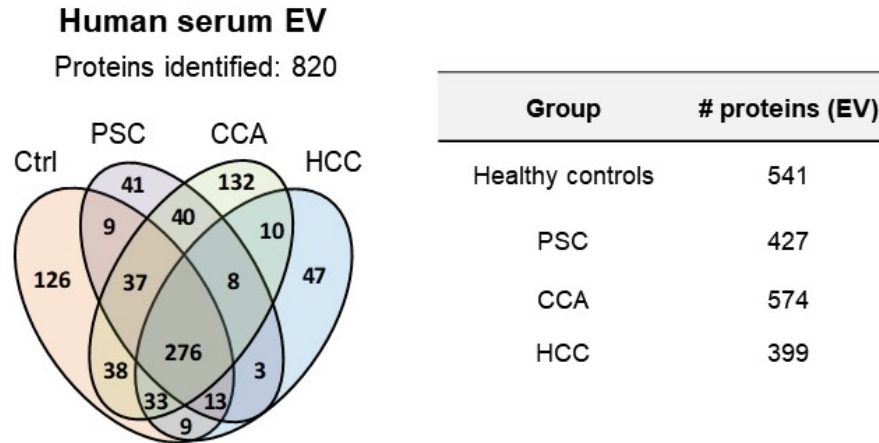
Figura R1. Caracterización de EVs de suero. La validación del protocolo de aislamiento de EVs de suero se realizó utilizando suero de individuos sanos. A) Imágenes de TEM de EVs aisladas de suero de individuos sanos. B) *Immunoblots* representativos de los marcadores de EVs CD9, CD63 y CD81, así como de la proteína de retículo endoplasmático GRP78 (control negativo), tanto en EVs de suero como en extracto celular total (WCE) de NHC. C) Análisis del tamaño y concentración de las EVs aisladas de suero de pacientes con PSC (n=30), CCA (n=41), HCC (n=29) y controles sanos (n=32).

R.2 Análisis del contenido proteico de las EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos

La composición proteica de las EVs aisladas de suero de los pacientes con PSC, CCA, HCC y de individuos sanos se determinó mediante espectrometría de masas y cuantificación sin marcaje o “*label free*”. En consonancia con los resultados obtenidos mediante *immunoblot*, se identificaron diversos marcadores proteicos de EVs en las vesículas aisladas de dichos pacientes y controles sanos, incluyendo CD9, CD63 y

CD81. Además, se identificó la presencia del marcador flotilin-1, el cual no fue analizado mediante *immunoblot*. En total se identificaron un total de 820 proteínas diferentes, 427 en PSC, 574 en CCA, 399 en HCC y 541 en individuos sanos (Fig. R2A).

A



B

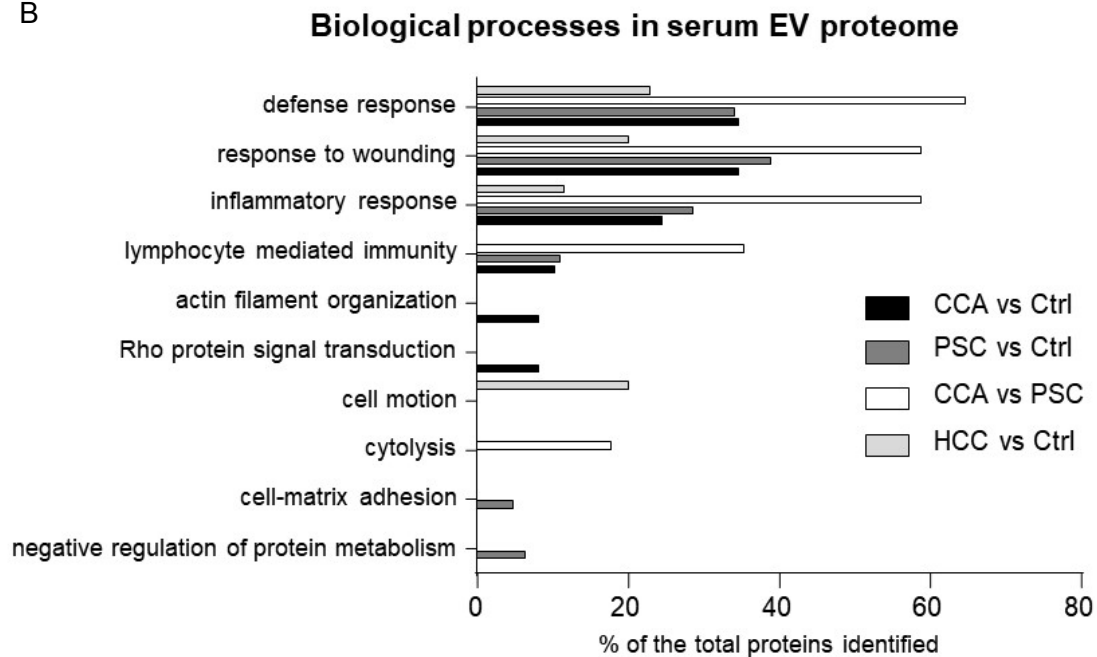


Figura R2. Análisis proteómico diferencial de EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos. A) Diagrama de Venn mostrando el total de proteínas identificadas en EVs de suero de cada grupo experimental (PSC, CCA, HCC y controles sanos) y entre ellos (2 péptidos identificados por proteína, FDR<1%). B) Análisis de los procesos biológicos en los que participan las proteínas diferencialmente expresadas en las EVs de suero de pacientes con CCA vs PSC, así como en CCA, PSC, HCC vs controles sanos mediante *Gene Ontology* (Base de datos DAVID).

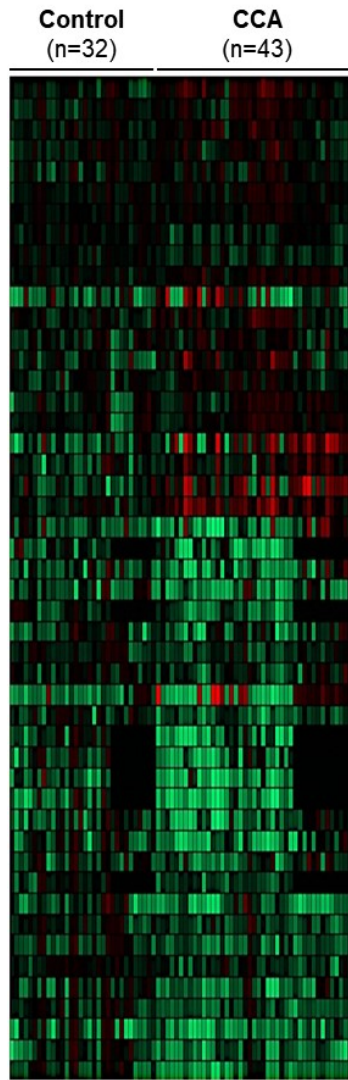
El análisis diferencial del contenido proteico en EVs identificó un total de 95 proteínas diferencialmente expresadas entre CCA vs controles sanos, 161 entre PSC vs controles sanos, 50 entre CCA vs PSC, y 98 entre HCC vs controles sanos. El análisis de *Gene Ontology* (GO) reveló que las proteínas diferencialmente expresadas en los grupos PSC, CCA, HCC vs controles sanos, así como entre CCA vs PSC, están mayoritariamente relacionadas con la activación de respuesta a daño tisular, defensa contra infecciones, respuesta inflamatoria y activación inmune (Fig. R2B).

Posteriormente, se procedió a la determinación del valor diagnóstico de las proteínas diferencialmente expresadas entre las EVs de suero de los diferentes grupos experimentales. Además, para poder determinar la capacidad diagnóstica real de los nuevos biomarcadores, sus valores se compararon con los de los marcadores tumorales en suero *carbohydrate antigen 19-9* (CA19-9) y alfa fetoproteína (AFP), los dos marcadores tumorales séricos más utilizados en la práctica clínica para el diagnóstico y seguimiento del CCA y el HCC, respectivamente.

Entre las proteínas diferencialmente expresadas en EVs de suero de pacientes con CCA vs controles sanos destacan la *aminopeptidase N* (AMPN), *paneteseinase* (VNN1) y la *polymeric immunoglobulin receptor* (PIGR), las cuales presentaron la mejor capacidad diagnóstica con valores de área debajo de la curva ROC (AUC) de 0,878, 0,876 y 0,844, respectivamente. Estos valores se encuentran próximos a los del CA19-9, con un AUC de 0,907 (Fig. R3A). En el caso de las proteínas diferencialmente expresadas entre las EVs de suero de pacientes con PSC vs controles sanos destacan AMPN, *ficolin-1* (FCN1) y *nepilysin* (NEP) con valores de AUC de 0,789, 0,771 y 0,761, respectivamente (Fig. R3B). Puesto que la presencia de PSC es un factor de riesgo para el desarrollo del CCA, se estudió el valor de AUC de las proteínas diferencialmente expresadas entre ambos grupos de pacientes. Así, *fibrinogen gamma chain* (FIBG), *alpha-1-acid glycoprotein 1* (A1AG1) y *S100A8* (S10A8) mostraron los mejores valores para el diagnóstico diferencial entre ambas patologías con valores de AUC de 0,796, 0,794 y 0,759, respectivamente (Fig. R3C). Dichos valores diagnósticos

fueron similares al del CA19-9 (i.e. 0,819). Es importante destacar que varias de las proteínas con mayor valor diagnóstico en la comparativa CCA vs PSC mejoran notablemente su capacidad diagnóstica cuando se compararon los valores de CCAs de fase temprana (estadios I y II) vs PSC, los cuales fueron superiores a los valores de CA19-9 en estas condiciones (Fig. R3C). Entre estas proteínas destacaron *ficolin-2* (FCN2), *inter-alpha-trypsin heavy chain H4* (ITIH4) y FIBG que presentaron valores de AUC de 0,956, 0,881 y 0,881, respectivamente. Como se ha mencionado anteriormente, el valor de CA19-9 para esta comparativa (0,736) fue claramente menor al de las proteínas analizadas (Fig. R3C). Por otro lado, se analizó la capacidad diagnóstica de las proteínas diferencialmente expresadas en las EVs de suero de pacientes con HCC vs controles sanos. Donde destacaron *galectin-3-binding protein* (LG3BP) y PIGR con valores de AUC de 0,904 y 0,837, respectivamente. Estos valores fueron superiores a los de alfa fetoproteína (AFP) que presentó un valor de AUC de 0,802 (Fig. R3D). Además, las proteínas FIBG, A1AG1 y *vitamin D-binding protein* (VTDB) mostraron mayores valores de AUC (0,894, 0,845 y 0,823, respectivamente) que el CA19-9 (0,801) y AFP (0,753) para el diagnóstico diferencial del iCCA vs HCC (Fig. R3D).

A



Fold change



Cohort #1

Protein	CCA (n=13) vs Control (n=10)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
VNN1	92.3	90.0	0.983	<0.001
CRP	92.3	90.0	0.954	<0.001
LBP	92.3	90.0	0.946	<0.001
APOF	84.6	90.0	0.938	<0.001
FIBG	84.6	90.0	0.933	0.001
FCN1	84.6	90.0	0.915	0.001
KV307	84.6	90.0	0.915	0.001
SAA1	76.9	90.0	0.908	<0.01
KRT83	69.2	100	0.885	<0.01
GGT1	76.9	100	0.867	<0.01
CA19-9	84.6	100	0.900	<0.001

Cohort #2

Protein	CCA (n=30) vs Control (n=22)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
PIGR	83.3	100	0.945	<0.001
AMPN	86.2	81.8	0.915	<0.001
FIBG	93.3	72.7	0.845	<0.001
IGHA1	76.7	86.3	0.839	<0.001
VNN1	83.3	63.6	0.824	<0.001
IGHA2	83.3	72.7	0.824	<0.001
A1AT	89.7	68.1	0.799	<0.001
LG3BP	66.7	81.8	0.777	0.001
GPC5C	66.7	72.7	0.771	0.001
PPBT	73.3	68.1	0.764	0.001
CA19-9	82.8	100	0.936	<0.001

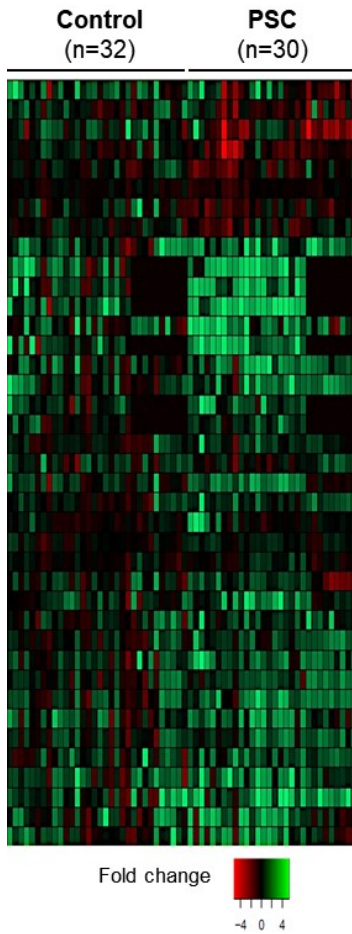
All patients

Protein	CCA (n=43) vs Control (n=32)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
AMPN	90.7	65.6	0.878	<0.001
VNN1	72.1	87.5	0.876	<0.001
PIGR	83.7	71.8	0.844	<0.001
IGHA1	81.4	75.0	0.820	<0.001
CRP	79.1	68.7	0.808	<0.001
GGT1	72.1	87.5	0.786	<0.001
IGHA2	72.1	78.1	0.775	<0.001
FIBG	79.1	75.0	0.767	<0.001
NEP	65.1	81.2	0.761	<0.001
GPC5C	65.1	75.0	0.741	<0.001
CA19-9	81.4	100	0.907	<0.001

Cohort #2

Protein	CCA I-II (n=13) vs Control (n=22)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
PIGR	75.0	95.4	0.905	<0.001
AMPN	91.7	72.7	0.833	<0.01
FIBG	100	68.1	0.833	<0.01
IGHG4	66.7	96.4	0.818	<0.01
IGHA1	91.7	59.0	0.814	<0.01
LG3BP	75.0	77.2	0.807	<0.01
HV102	91.7	63.6	0.803	<0.01
A1AT	83.3	72.7	0.788	<0.01
IGHA2	83.3	72.7	0.788	<0.01
SAMP	75.0	86.3	0.784	<0.01
CA19-9	81.8	100	0.916	<0.001

B



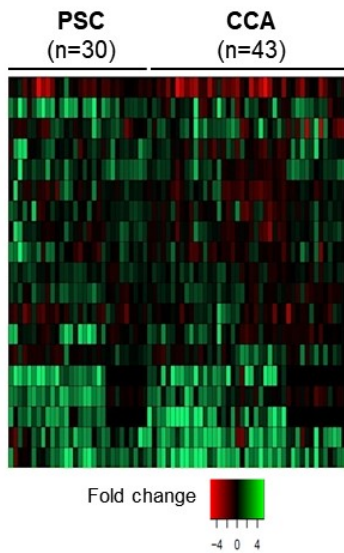
Protein	PSC (n=9) vs Control (n=10)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
NEP	100	90.0	0.967	0.001
APOF	88.9	90.0	0.944	0.001
FCN1	100	80.0	0.889	<0.01
A2ML1	77.8	90.0	0.889	<0.01
IGHD	88.9	80.0	0.878	<0.01
LDHA	88.9	80.0	0.867	<0.01
VNN1	77.8	90.0	0.867	<0.01
AMPE	88.9	80.0	0.844	<0.05
BAIP2	100	70.0	0.844	<0.05
UGPA	88.9	80.0	0.833	<0.05

Protein	All patients			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
AMPN	83.3	62.5	0.789	<0.001
FCN1	76.7	68.7	0.771	<0.001
NEP	63.3	90.6	0.761	<0.001
PIGR	76.7	71.8	0.742	0.001
VNN1	76.7	59.3	0.741	0.001
GPC5C	63.3	75.0	0.733	<0.01
IGHM	86.7	62.5	0.732	<0.01
KV301	79.8	87.5	0.708	<0.01
A2MG	66.7	71.8	0.699	<0.01
BAIP2	66.7	62.5	0.696	<0.01

Protein	PSC (n=21) vs Control (n=22)			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
PIGR	90.5	68.2	0.864	<0.001
AMPN	81.0	63.6	0.790	0.001
GPC5C	76.2	59.1	0.768	<0.01
KV401	81.0	68.1	0.766	<0.01
KV121	61.9	77.2	0.742	<0.01
KV309	85.7	50.0	0.742	<0.01
KNG1	76.2	72.7	0.736	<0.01
ABCBB	66.7	86.4	0.732	<0.01
KV301	61.9	90.9	0.729	0.01
IGKC	81.0	54.5	0.729	0.01

Protein	All patients			
	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
NEP	70.8	90.6	0.806	<0.001
FCN1	70.8	78.1	0.790	<0.001
AMPN	83.3	65.6	0.781	<0.001
VNN1	79.2	56.2	0.758	0.001
DPP4	87.5	53.1	0.740	<0.01
IGHM	83.3	62.5	0.728	<0.01
HV206	66.7	65.6	0.719	<0.01
C1QA	75.0	59.3	0.710	<0.01
PIGR	70.8	71.8	0.701	<0.05
CRP	70.8	65.6	0.699	<0.05

C



Protein	Cohort #1			
	CCA (n=13) vs PSC (n=9)			
Protein	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
CO6A1	100	66.7	0.898	<0.01
FIBA	83.3	88.9	0.898	<0.01
CRP	76.9	100	0.880	<0.01
A1AG1	84.6	88.9	0.863	<0.01
FIBG	100	66.7	0.855	<0.01
PON1	83.3	77.8	0.852	<0.01
FIBB	91.7	77.8	0.814	<0.05
GGT1	75.0	88.9	0.806	<0.05
SA2	100	44.4	0.806	<0.05
H4	83.3	66.7	0.806	<0.05
CA19-9	84.6	100	0.889	<0.01

Protein	All patients			
	CCA (n=43) vs PSC (n=30)			
Protein	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
FIBG	88.4	63.3	0.796	<0.001
A1AG1	76.7	70.0	0.794	<0.001
S10A8	69.8	66.6	0.759	<0.001
S10A9	74.4	60.0	0.746	<0.001
SAMP	79.1	57.6	0.740	0.001
FIBB	74.4	66.0	0.740	0.001
GGT1	74.4	63.3	0.720	<0.01
CRP	67.4	66.7	0.711	<0.01
FCN2	65.1	70.0	0.706	<0.01
IGHA1	74.4	70.1	0.701	<0.01
CA19-9	81.4	86.6	0.819	<0.001

Protein	Cohort #2			
	CCA (n=30) vs PSC (n=21)			
Protein	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
FIBG	93.3	80.9	0.895	<0.001
FCN2	100	52.3	0.829	<0.001
S10A9	86.7	71.4	0.794	<0.001
S10A8	86.7	57.1	0.773	0.001
SAMP	63.3	80.9	0.765	0.001
A1AG1	70.0	66.7	0.763	0.001
CO3	66.7	80.9	0.752	<0.01
LRP1	63.3	85.7	0.749	<0.01
PROS	56.7	85.7	0.727	<0.01
IC1	53.3	85.7	0.724	<0.01
CA19-9	79.3	85.7	0.811	<0.001

Protein	All patients			
	CCA I-II (n=13) vs PSC (n=30)			
Protein	SEN (%)	SPE (%)	AUC	p value
FCN2	100	80.9	0.956	<0.001
ITIH4	91.7	80.9	0.881	<0.001
FIBG	91.7	80.9	0.881	<0.001
IC1	75.0	80.9	0.821	<0.01
SAMP	75.0	80.9	0.821	<0.01
LBP	83.3	76.1	0.813	<0.01
CO3	58.3	95.2	0.798	<0.01
LRP1	75.0	66.7	0.786	<0.01
MASP1	58.3	85.7	0.786	<0.01
PROS	75.0	71.4	0.778	<0.01
CA19-9	75.0	86.6	0.736	<0.05

D

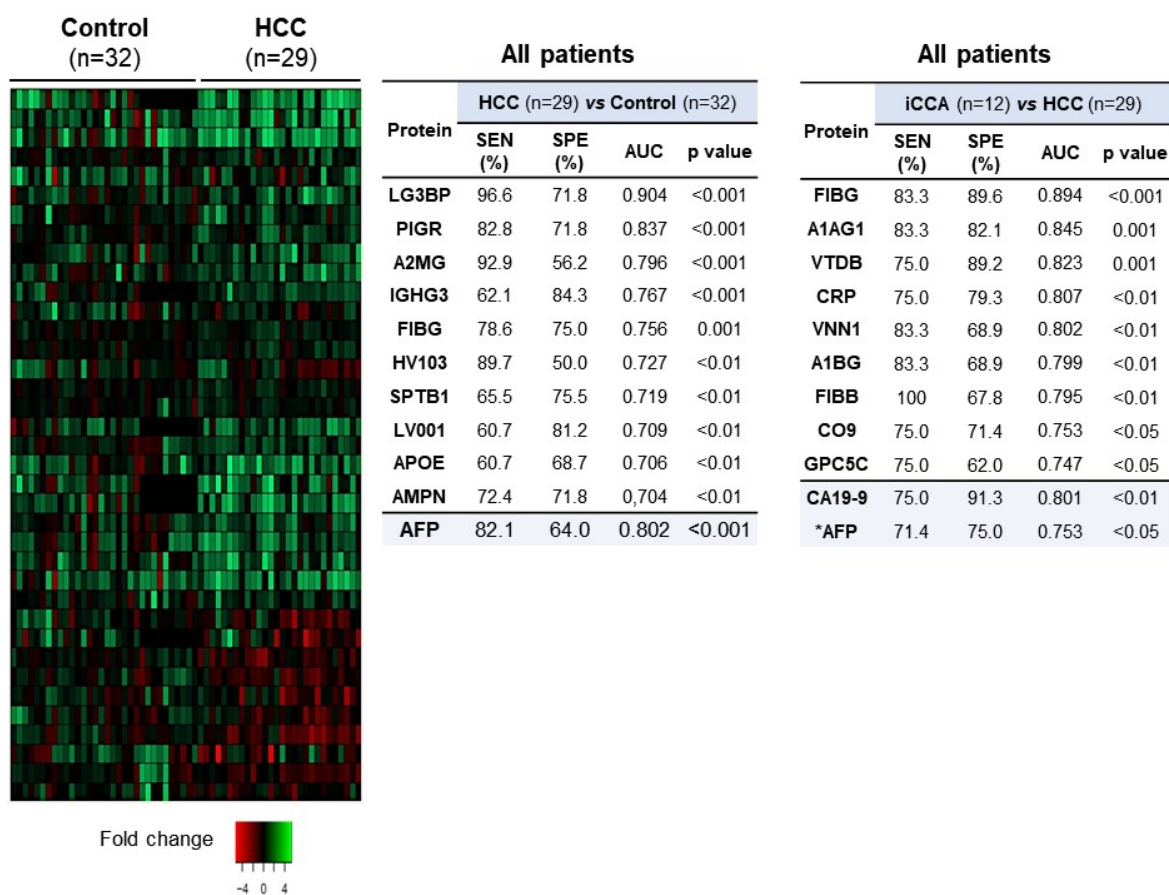


Figura R3. Análisis proteómico diferencial y valor diagnóstico de las EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos. *Heatmaps* de las proteínas diferencialmente expresadas entre las EVs de suero en los diferentes grupos de pacientes con el valor diagnóstico de los 10 mejores candidatos por comparativa: A) CCA vs individuos sanos (controles), B) PSC vs individuos sanos (controles), C) CCA vs PSC, y D) HCC vs individuos sanos (controles). SEN, sensibilidad; SPE, especificidad; AUC, área debajo de la curva ROC.

Cabe resaltar que algunos de los biomarcadores hallados se encuentran diferencialmente expresados en los pacientes con CCA o HCC en comparación con el resto de grupos. Así, los niveles de VNN1, *C reactive protein* (CRP), FIBG, *immunoglobulin heavy constant alpha 1* (IGHA1), A1AG1 y *gamma-glutamyltranspeptidase 1* (GGT1) se encuentran elevados en pacientes con CCA vs HCC, PSC y controles sanos (Fig. R4). Por otro lado, los niveles de LG3BP se encuentran aumentados respecto a pacientes con CCA, PSC e individuos sanos (Fig. R4).

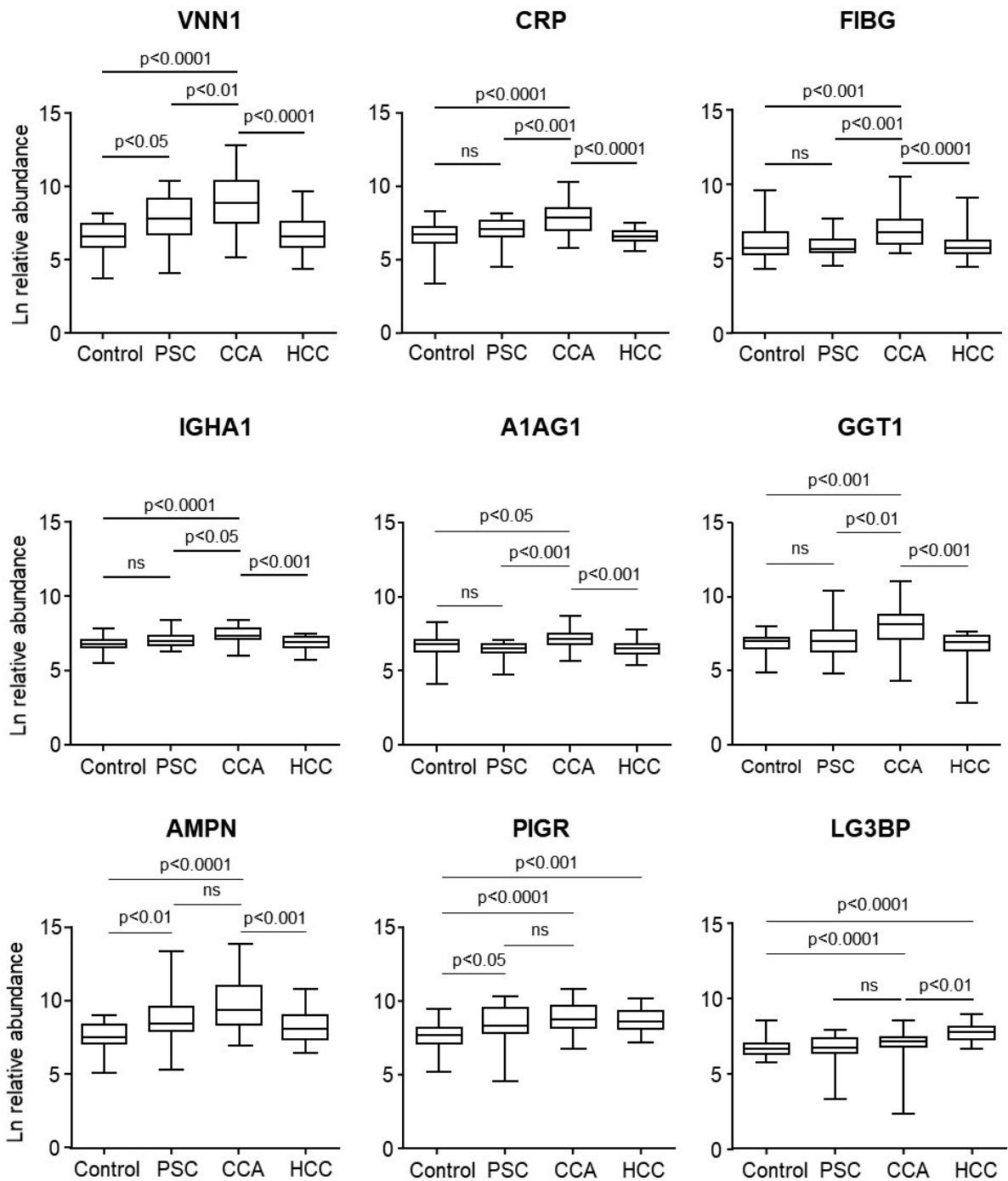


Figura R4. Diagramas *box plot* de los mejores biomarcadores candidatos en EVs de suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos (control).

Para validar la presencia y los niveles de expresión de algunas de las proteínas seleccionadas en las comparativas anteriores, así como su posible detección utilizando suero total, se procedió a su determinación mediante *immunoblot*. En concreto, se analizó la presencia de PIGR, AMPN y CRP tanto en el extracto de EVs como en suero total cargando la misma cantidad de proteína en cada muestra. Los resultados de los *immunoblots* confirmaron el enriquecimiento de PIGR, AMPN en la fracción de EVs en comparación con suero total. Por el contrario, aunque la proteína CRP se encuentra abundantemente presente en EVs su expresión es mayor en suero total, indicando que también se encuentra elevada en la fracción no vesicular del suero. (Fig. R5). Además, se confirmó la sobreexpresión de estos 3 biomarcadores analizados en pacientes con CCA en comparación con PSC y controles sanos tanto en el extracto de EVs como en suero total (Fig. R5). Estos datos pueden ser de gran importancia para la posible translación de los resultados a la práctica clínica, ya que permite la detección de biomarcadores proteicos en EVs utilizando directamente suero total sin la necesidad aislar la fracción de EVs.

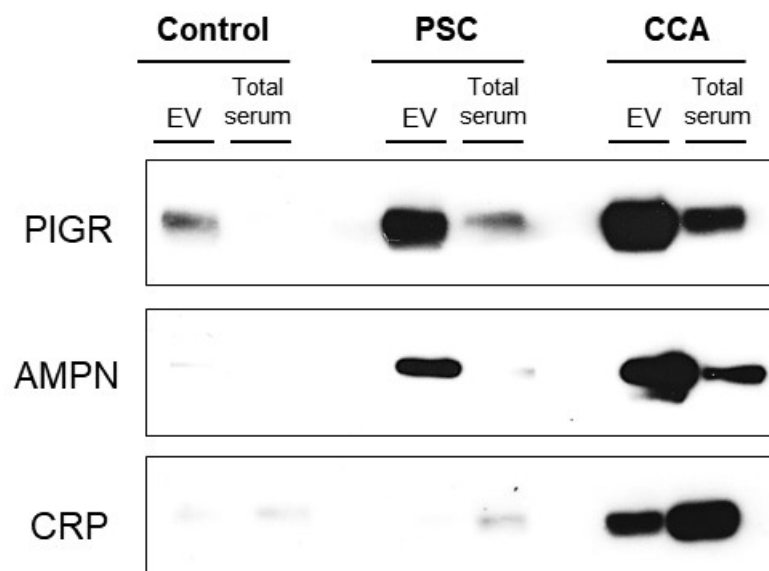
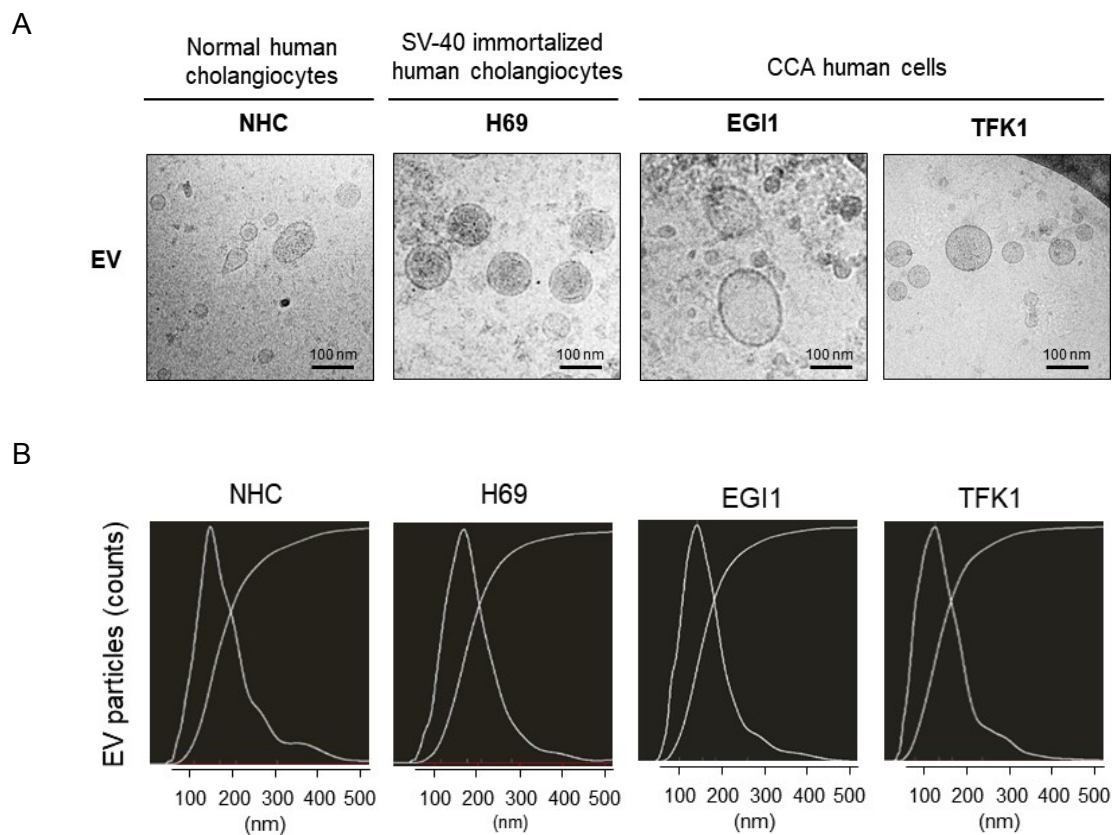


Figura R5. Validación de biomarcadores proteicos en EVs y suero total de pacientes con PSC, CCA y controles sanos mediante *immunoblot*. Se cargaron 10 µg de proteína de cada muestra de EVs y suero total de los pacientes.

R.3 Caracterización de EVs derivadas de colangiocitos humanos normales y células de colangiocarcinoma humano en cultivo

Se aislaron y caracterizaron las EVs producidas por colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados con SV-40 pero no tumorales (H69) y de 2 líneas celulares de CCA humano (EGI1 y TFK1). Estas EVs derivadas de células en cultivo fueron caracterizadas de modo similar a las EVs presentes en suero de pacientes mediante TEM, *immunoblot* (CD9, CD63 y CD81) y NTA. Las imágenes de TEM confirmaron la presencia de EVs en todos los tipos de cultivos celulares con la típica morfología esférica y tamaños entre 50 y 200 nm (Fig. R6A). El diámetro (moda \pm SEM) de las EVs fue 152,9 \pm 6, 167,7 \pm 2, 143,8 \pm 10,5 y 142,7 \pm 12,2 nm en NHC, H69, EGI1 y TFK1, respectivamente, sin que estas diferencias fueran significativas entre los distintos tipos celulares (Fig. R6B).



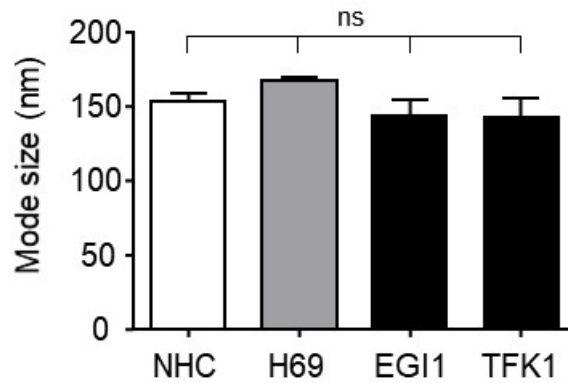
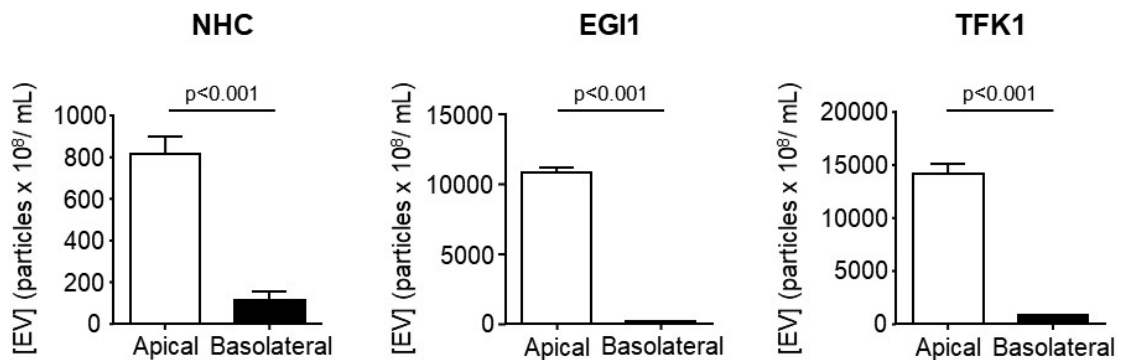


Figura R6. Caracterización de las EVs producidas por colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados (SV-40) y células humanas de CCA (EGI1 y TFK1). A) Imágenes de TEM de las EVs secretadas por NHC, H69, EGI1 y TFK1. B) Determinación del tamaño de las EVs mediante *nanoparticle tracking analysis* (NTA).

El análisis del número de EVs secretadas por la membrana apical o basolateral de células NHC, EGI1 y TFK1 indicó que los 3 tipos celulares secretan más EVs por la membrana apical que por la basolateral (Fig. R7A). El estudio de la presencia de marcadores proteicos típicos de EVs tales como CD9, CD63 y CD81 por *immunoblot* demostró un enriquecimiento en estas proteínas en las EVs totales aisladas de los 4 tipos celulares (NHC, H60, EGI1 y TFK1). Por otro lado, tal y como se esperaba, dichas EVs no presentaron expresión del marcador de retículo endoplasmático GRP78 (control negativo) en comparación con sus respectivos extractos celulares totales (Fig. R7B). Todos estos datos demuestran un correcto aislamiento de EVs de los cultivos celulares.

A



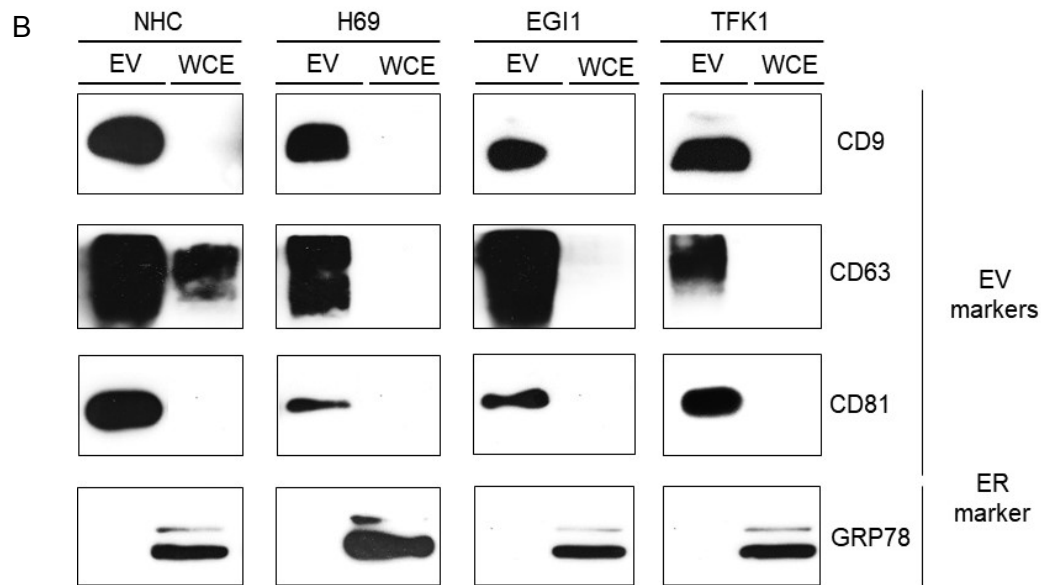
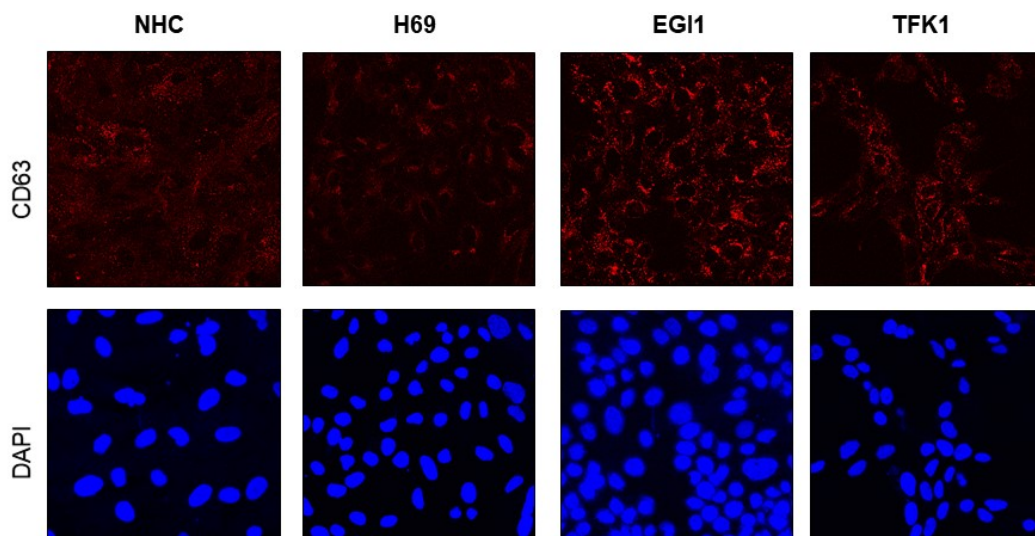


Figura R7. Caracterización de EVs producidas por colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados (H69) y células humanas de CCA (EGI1 y TFK1). A) Determinación de la concentración de EVs producidas por la membrana apical o basolateral de células NHC, EGI1 y TFK1 mediante NTA. B) *Immunoblots* representativos del enriquecimiento de los marcadores de EVs CD9, CD63 y CD81 en EVs secretadas por células CHN, H69, EGI1 y TFK1 en comparación con extractos celulares totales (WCE). El marcador de retículo endoplasmático Grp78 se usó como control negativo.

Finalmente, se analizó la expresión del marcador de EV CD63 por inmunofluorescencia en células NHC, H69, EGI1 y TFK1 mostrando sobreexpresión de esta proteína en las líneas celulares de CCA en comparación con NHC y H69 (Fig. R8). Estos datos indican que pueden existir alteraciones en el tráfico vesicular en las células de CCA.



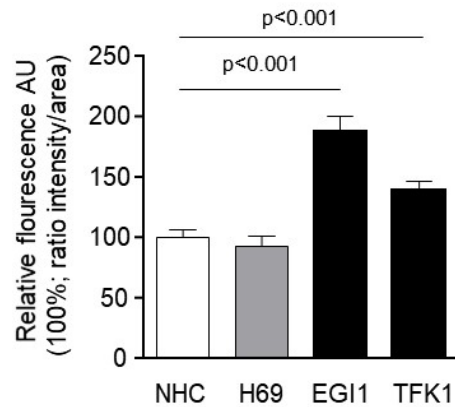


Figura R8. Inmunofluorescencia de CD63 en colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados (H69) y células humanas de CCA (EGI1 y TFK1). Imágenes de inmunofluorescencia (IF) (magnificación 40x) del marcador de EV CD63 (rojo) en los cultivos celulares. Núcleos tenidos con DAPI (azul).

R.4 Análisis del contenido proteico de EVs y extractos celulares totales (WCE) derivados de colangiocitos normales y células de CCA

El contenido proteico de EVs y extractos celulares totales (WCE) fue analizado en colangiocitos humanos normales (NHC), H69 y células de CCA humano EGI1 y TFK1 mediante espectrometría de masas y cuantificado sin marcaje (i.e. “*label free*”). Se identificó un gran número de proteínas tanto en EVs como en WCE de los distintos tipos celulares: a) 820 y 1318 proteínas en EVs y WCE de NHC, respectivamente; b) 1440 y 2870 proteínas en EVs y WCE de H69, respectivamente; c) 1635 y 2156 proteínas en EVs y WCE de EGI1, respectivamente; y d) 1322 y 1926 proteínas en EVs y WCE de TFK1, respectivamente (Fig. R9). Centrándonos en las proteínas presentes en EVs secretadas por la membrana apical vs basolateral de las células, se identificó un gran número de proteínas únicamente presentes en la fracción apical. Concretamente, se identificaron 450, 777 y 367 proteínas exclusivamente en EVs apicales vs 8, 82 y 142 proteínas exclusivas en EVs basolaterales de NHC, EGI1 y TFK, respectivamente (Fig. R9).

Por otro lado, tal y como se esperaba, se detectó un enriquecimiento de los marcadores de EVs CD9, CD63 y CD81 en las EVs aisladas de los cultivos celulares

en comparación con sus respectivos WCEs. Además, se detectó un enriquecimiento en otros marcadores de EVs tales como *tumor susceptibility gene 101 protein* (TSG101), *flotilin-1*, *anexin A2* y *heat shock protein 90 alpha* (HSP90AA1). El análisis funcional de las proteínas mediante *Gene Ontology* confirmó que las proteínas enriquecidas en la fracción de EVs está relacionada con procesos fisiológicos de la formación de EVs (Fig. R10A).

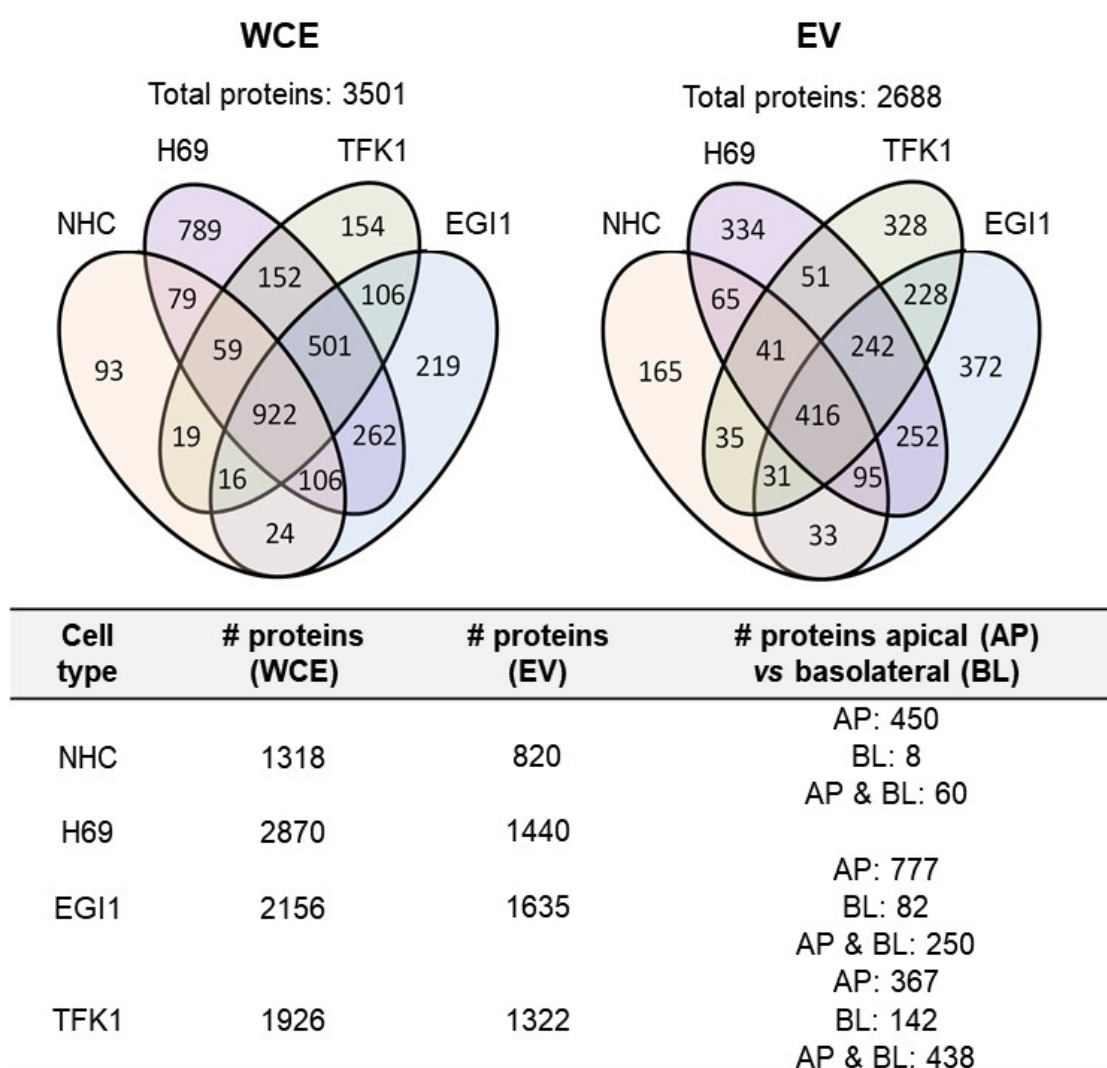
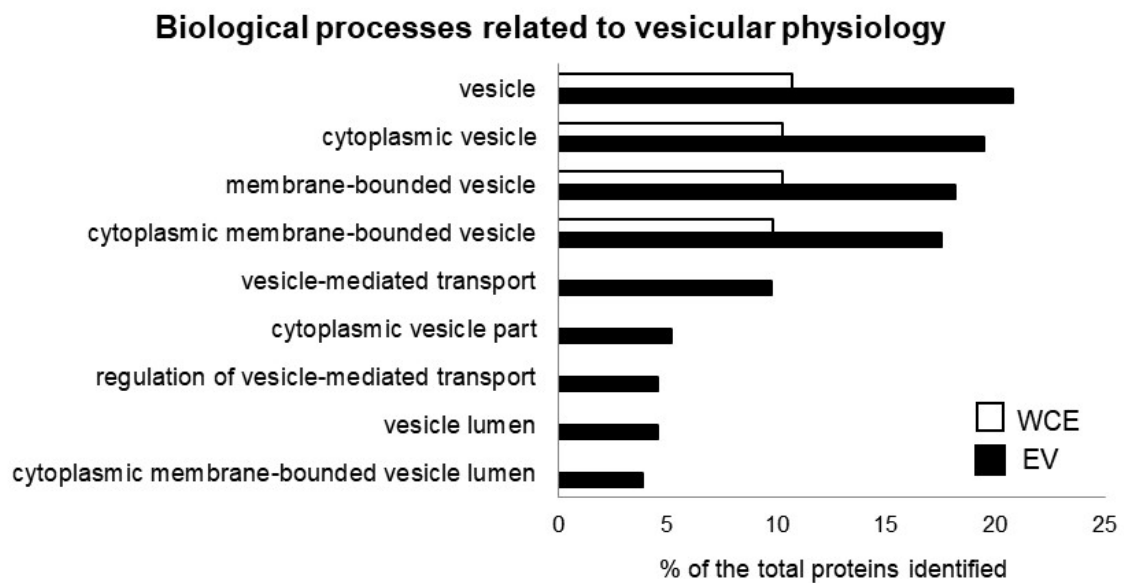


Figura R9. Análisis proteómico de EVs y extractos celulares totales (WCE) de colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados (H69) y células humanas de CCA (EGI1 y TFK1). Diagramas de Venn mostrando el número de proteínas identificadas por grupo y el número de proteínas que se comparten entre ellos.

El análisis de componentes principales (*“principal component analysis”*) en los distintos cultivos celulares reveló un proteoma diferencial entre los diferentes tipos celulares tanto en los extractos de EVs como en WCEs. En el caso de los WCEs, los 2 tipos de células de CCA presentaron un proteoma claramente relacionado y muy diferente al presentado por células NHC y H69 (Fig. R10B). Interesantemente, el proteoma de las células H69 (inmortalizadas con SV-40) fue más similar a las células de CCA que a los colangiocitos normales (NHC), por lo que se desestimó su uso como células control normales para los siguientes experimentos. En el caso de las EVs, aunque la heterogeneidad entre los distintos tipos celulares fue mayor, se apreciaron tendencias similares, siendo los proteomas de EVs de ambas líneas tumorales los más relacionadas entre sí y diferentes al de NHC (Fig. R10B).

A



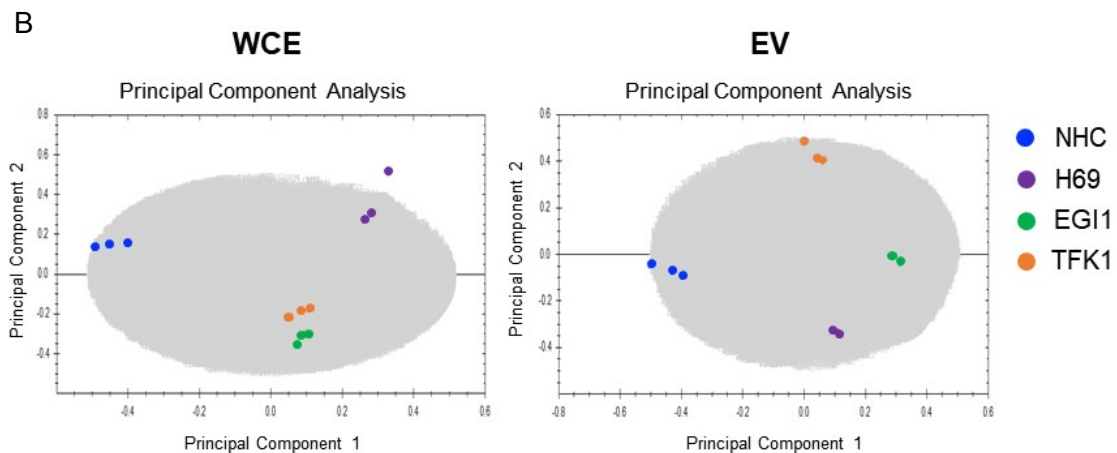
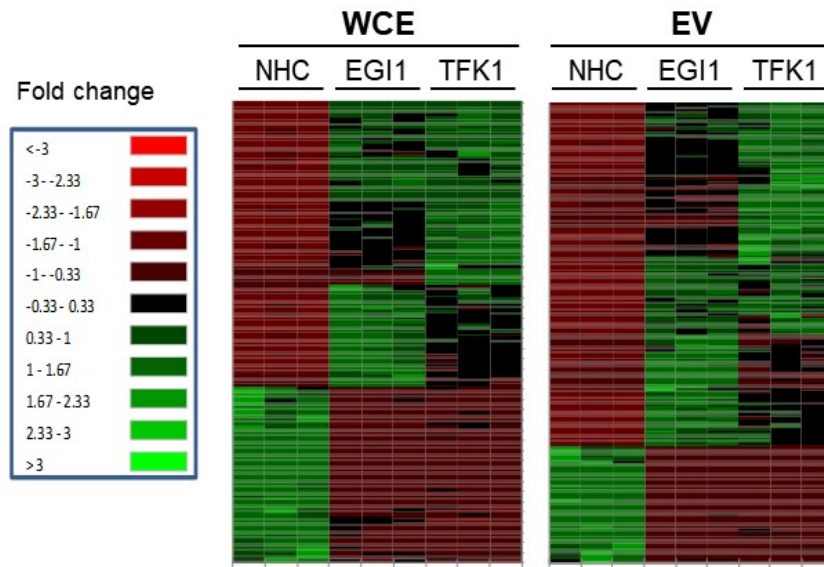


Figura R10. Análisis proteómico de las EVs y extractos celulares totales (WCE) de NHC, H69 y células de CCA (EGI1 y TFK1). A) Análisis de *Gene Ontology* (base de datos DAVID) comparando los procesos biológicos relacionados con la fisiología de vesículas tanto en la fracción de EVs como en WCE de los cultivos celulares. B) Análisis de componentes principales en EVs y WCEs de los cultivos celulares.

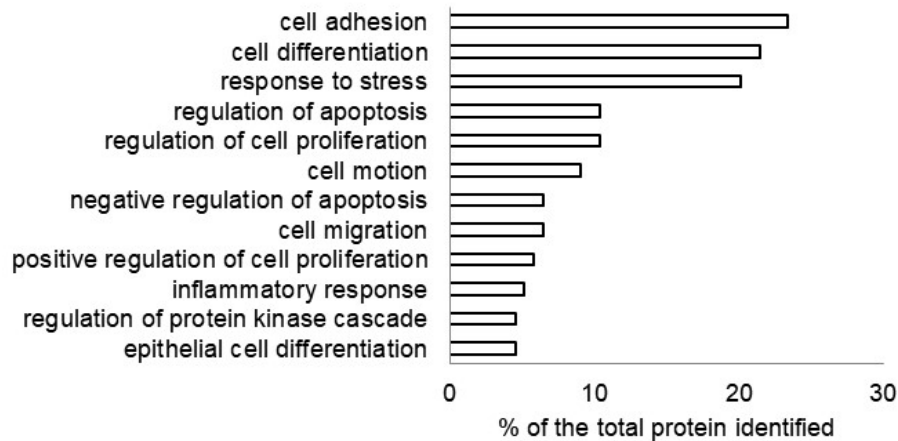
El análisis diferencial del contenido proteico compartido por EVs de ambas líneas de CCA vs NHC reveló un total de 155 proteínas diferencialmente expresadas, de las que 108 mostraban una expresión aumentada y 47 disminuida (Fig. R11A). Para comprender los procesos biológicos en los que pueden estar implicadas dichas proteínas se realizaron dos análisis bioinformáticos usando los programas DAVID e *Ingenuity pathway analysis* (IPA), así como un análisis bibliográfico de las proteínas. Las anotaciones de *Gene Ontology* proporcionadas por la base de datos de DAVID indicaron que un gran número de estas proteínas enriquecidas en las EVs de células de CCA forman parte de importantes procesos biológicos asociados a carcinogénesis, tales como proliferación celular, inflamación, supervivencia o diferenciación, y especialmente en la promoción de la migración celular (Fig. R11B).

A



B

Biological processes related to tumorigenesis



Biological processes related to cellular migration

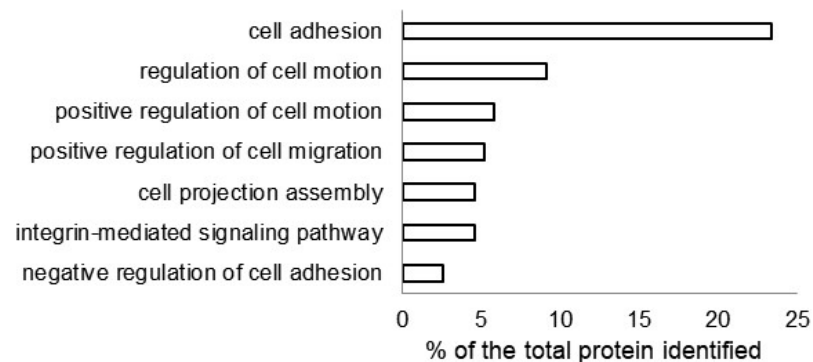


Figura R11. Análisis proteómico de EVs derivadas de colangiocitos humanos normales (NHC) en comparación con las células de CCA (EGI1 y TFK1). A) *Heatmaps* de las proteínas diferencialmente expresadas entre EVs y WCEs de NHC en comparación con EGI1 y TFK1 (n=3). B) Análisis de los procesos biológicos relacionados con las proteínas diferencialmente expresadas (*Gene Ontology*) entre EVs de ambas líneas celulares de CCA en comparación con EVs de NHC.

Estos datos fueron confirmados y expandidos mediante el programa bioinformático IPA, el cual relacionó las proteínas diferencialmente expresadas en EVs de CCA con la activación de rutas clave para la migración celular (i.e. *integrin-linked protein kinase* (ILK), Rho A o RAC), proliferación celular y supervivencia (Tablas R1, R2, Fig. R12).

Table R1. Ingenuity pathway analysis (IPA) of differentially expressed proteins in CCA-derived EVs compared to NHC.

Biological functions	Z score	-log p value
Invasion	2.16	5.65
Dissemination	1.99	4.18
Proliferation	2.55	24.29
Cell death	-2.18	10.66

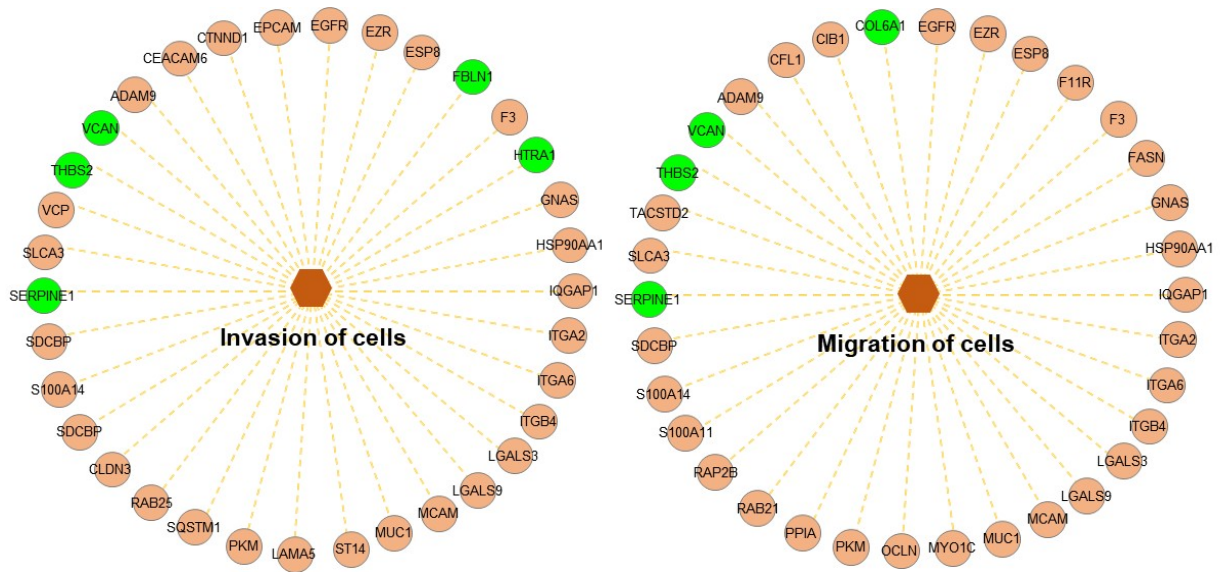
Biological functions related with tumor processes by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Z score represents the activation state of the upstream regulators related with such biological process (positive number represent activation and negative numbers inactivation). P values are represented as $-\log p$ value.

Table R2. Ingenuity pathway analysis (IPA) of differentially expressed proteins in CCA-derived EVs compared to NHC.

Canonical pathway	Z score	-log P value	Biological function
Integrin Signaling	1.63	3.14	Related with poor prognosis, proliferation, apoptosis resistance, promotion of invasion and metastasis.
Signaling by Rho Family GTPases	2.12	5.89	Promotion of migration, invasion, cell transformation, survival, angiogenesis and metabolism
ILK Signaling	1.89	4.15	Proliferation, survival, migration and invasion
RhoA Signaling	2.00	1.90	Migration and invasion
Rac Signaling	2.24	2.99	Regulation of intercellular adhesion, cell polarity, cell migration, proliferation and survival

Predicted activation of canonical pathway based on proteins present in CCA EVs, calculated with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. Z score represent the activation state of the upstream regulator of the pathway (positive number represent activation and negative numbers inactivation). P values are represented as $-\log p$ value.

A



B

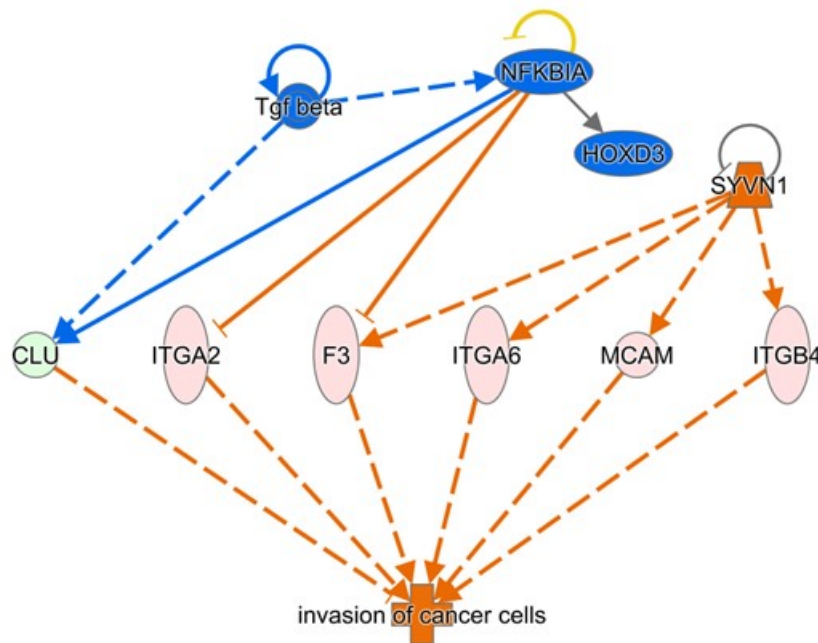


Figura R12. Análisis proteómico mediante *Ingenuity pathway analysis* (IPA) de EVs derivadas de colangiocitos humanos normales (NHC) en comparación con células de CCA (EGI1 y TFK1). A) Diferentes proteínas desreguladas en las VE de CCA se relacionan con procesos de invasión y migración. Los círculos rojos representan las proteínas up reguladas en las VE de CCA y las verdes *down* reguladas. B) Red de interacción entre proteínas desreguladas en las VE de CCA que se relacionan con procesos de invasión de las células cancerígenas. Los círculos rojos representan las proteínas up reguladas en las VE de CCA y las verdes *down* reguladas.

Por último, el análisis bibliográfico individual de estas proteínas reveló un enriquecimiento en las EVs de CCA de importantes proteínas oncogénicas tanto en CCA como en otros tumores, incluyendo al *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *mucin-1* (MUC1), *integrin beta-4* (ITGB4), *CUB domain-containing protein 1* (CDCP1), *epithelial cell adhesion molecule* o *calcium and integrin-binding protein 1* (CIB1), entre otras (Fig. R13A). Además, algunas de estas proteínas se encontraron diferencialmente expresadas en EVs derivadas de la membrana apical vs basolateral de las células (Fig. R13A). Finalmente, es importante destacar que los niveles de las proteínas *brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2* (BAIP2), *fibronectin* (FN1), *annexin A5* (ANXA5), *inter-alpha-trypsin inhibitor* (ITIH2), *filamin A* (FILMA) y *erythrocyte band 7 integral membrane protein* (STOM) se encontraron alterados tanto en EVs de suero de pacientes con CCA vs controles sanos como en ambas líneas de CCA humano vs NHC (Fig. R 13B).

A

Protein	EV			
	Fold change			
	EG11/NHC	EG11 AP/BL	TFK1/NHC	TFK1 AP/BL
EGFR	11	7.66	106	0.76
Mucin-1	39	Only AP	12	0.16
Integrin β4	20	2.73	19	2.88
EPCAM	120	3.33	188	1.38
Agrin	22	Only AP	12	Not detected
CIB1	463	Only AP	517	Only AP
EPS8	14	Only AP	22	0.21
TACSTD2	70	4.5	32	0.9
CDCP1	6	7.5	61	0.77
ADAM10	22	5.5	5	0.29

B

Common dysregulated proteins in serum EV of CCA patients and EV-derived from CCA cells							
Protein	Fold change: serum EV CCA vs control	AUC	p value	Fold change EV: EGI1 vs NHC	p value	Fold change TFK1 vs NHC	p value
BAIAP2	2.14	0.735	<0.01	65.15	<0.0001	55.32	<0.0001
FN1	0.62	0.242	<0.01	0.023	<0.0001	0.042	<0.0001
ANXA5	0.28	0.283	<0.001	0.201	<0.001	0.1	<0.001
ITIH2	0.77	0.390	<0.05	0.07	<0.0001	0.09	<0.0001
FLMA	0.23	0.366	<0.001	0.24	<0.0001	0.24	<0.0001
STOM	0.47	0.356	<0.05	0.12	<0.0001	0.087	<0.0001

Figura R13. Análisis proteómico de EVs derivadas de colangiocitos humanos normales (NHC) en comparación con células de CCA (EGI1 y TFK1). A) Lista de las proteínas oncogénicas más relevantes presentes en EVs derivadas de células de CCA vs NHC, y su abundancia relativa entre EVs apicales vs basolaterales. B) Proteínas cuya expresión se encuentra alterada tanto en EVs de suero de pacientes con CCA como en EVs de células de CCA con su correspondiente valor diagnóstico (AUC).

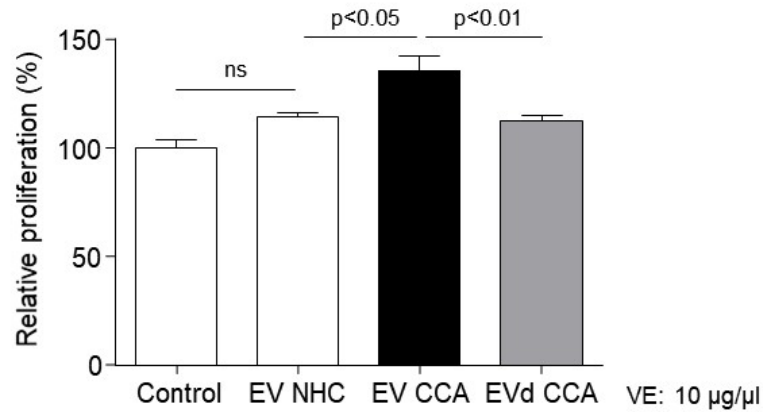
Todos estos datos ponen de manifiesto que las EVs producidas por las células de CCA poseen alteraciones en la expresión de proteínas oncogénicas claves en procesos de proliferación, supervivencia, migración, invasión y metástasis tumoral, pudiendo favorecer el desarrollo y crecimiento del CCA de forma autocrina/paracrina.

R.5 Análisis del papel oncogénico autocrino/paracrino de EVs derivadas de células de CCA

Con el objetivo de confirmar el papel pro-tumoral de EVs de CCA se realizaron ensayos de proliferación y migración con colangiocitos humanos normales (NHC) en cultivo. Los ensayos de proliferación mostraron que las EVs derivadas de células de CCA EGI1 inducen un aumento en la proliferación de las células NHC en comparación con EVs derivadas de NHC. Además, dicho efecto de las EVs de CCA no se observó cuando éstas fueron desnaturalizadas previamente a su incubación (condición control) (Fig. R14A). Por otro lado, se comprobó mediante *scratch-wound assay* que las EVs de

CCA estimulan la migración de las células NHC (Fig. R14B). Estos experimentos confirmaron la acción pro-oncogénica de las EVs derivadas de células de CCA sobre los colangiocitos humanos normales (NHC).

A



B

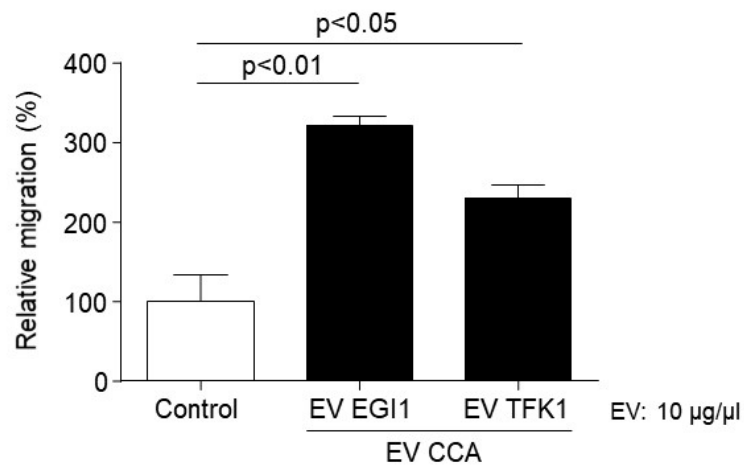
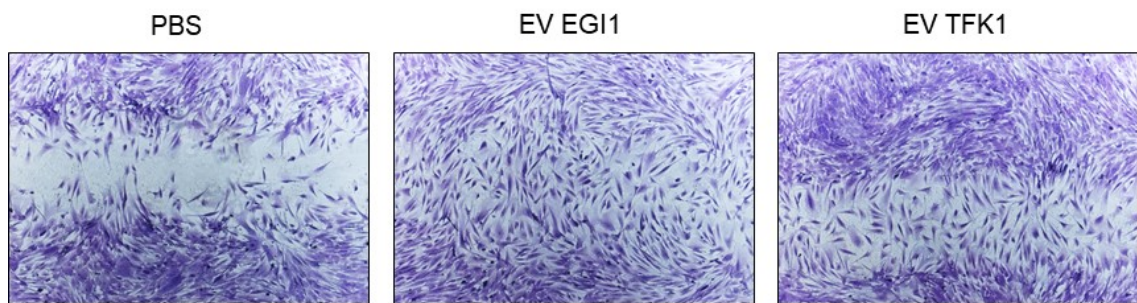


Figura R14. Efecto tumorigénico (proliferación y migración) de EVs de CCA sobre NHC en cultivo. A) Proliferación de los NHC en ausencia o presencia de EVs de CCA (EGI1: intactas o desnaturalizadas) (n=3). B) Migración celular mediante técnica de *scratch* en NHC en ausencia o presencia de EVs de CCA (EGI1 y TFK1) (n=4).

R.6 Determinación de la presencia de EVs de origen humano en suero de ratones inmunodeficientes con implantes orto-tópicos de CCA humano

Para comprobar si es posible la detección en suero de EVs producidas por células tumorales de CCA localizadas en el hígado, se realizó un modelo de CCA orto-tópico mediante la implantación de células de CCA humano (EGI1) en el hígado de ratones inmunodeficientes. El crecimiento de los tumores en el hígado se monitorizó mediante resonancia magnética nuclear (MRI) y dos meses después de su implantación, y tras confirmar su crecimiento, se procedió a la extracción de suero y al aislamiento de EVs para su posterior análisis mediante NTA y espectrometría de masas (Fig. R15A). El análisis por NTA evidenció que no existían diferencias en concentración y tamaño entre las EVs de suero aisladas de ratones con implantes tumorales o aisladas de ratones operados, pero sin implante tumoral (controles) (Fig. R15B). Por otra parte, el análisis proteómico reveló la presencia de los marcadores de EVs CD9 y CD81 en las EVs aisladas de suero tanto de los ratones con implantes tumorales como controles (datos no mostrados). Interesantemente, se identificaron 23 proteínas de origen humano con al menos dos péptidos diferentes por proteína exclusivamente humanos en EVs de suero procedentes de los ratones con implantes tumorales, mientras que ninguna de ellas fue identificada en EVs de ratones controles (Fig. R15C). Además, 9 de estas proteínas humanas fueron detectadas en EVs derivadas de células de CCA EGI1 (células usadas para formar los implantes) en cultivo (Fig. R15C). Por último, de esas 9 proteínas humanas presentes tanto en EVs de suero de los ratones implantados como en EVs de las células EGI1, 8 de ellas también fueron identificadas en EVs de suero de pacientes con CCA (Fig. R15C). Todos estos datos surgieron que EVs producidas por células tumorales en el hígado pueden ser identificadas en suero, pudiendo ser posibles biomarcadores no invasivos de enfermedad.

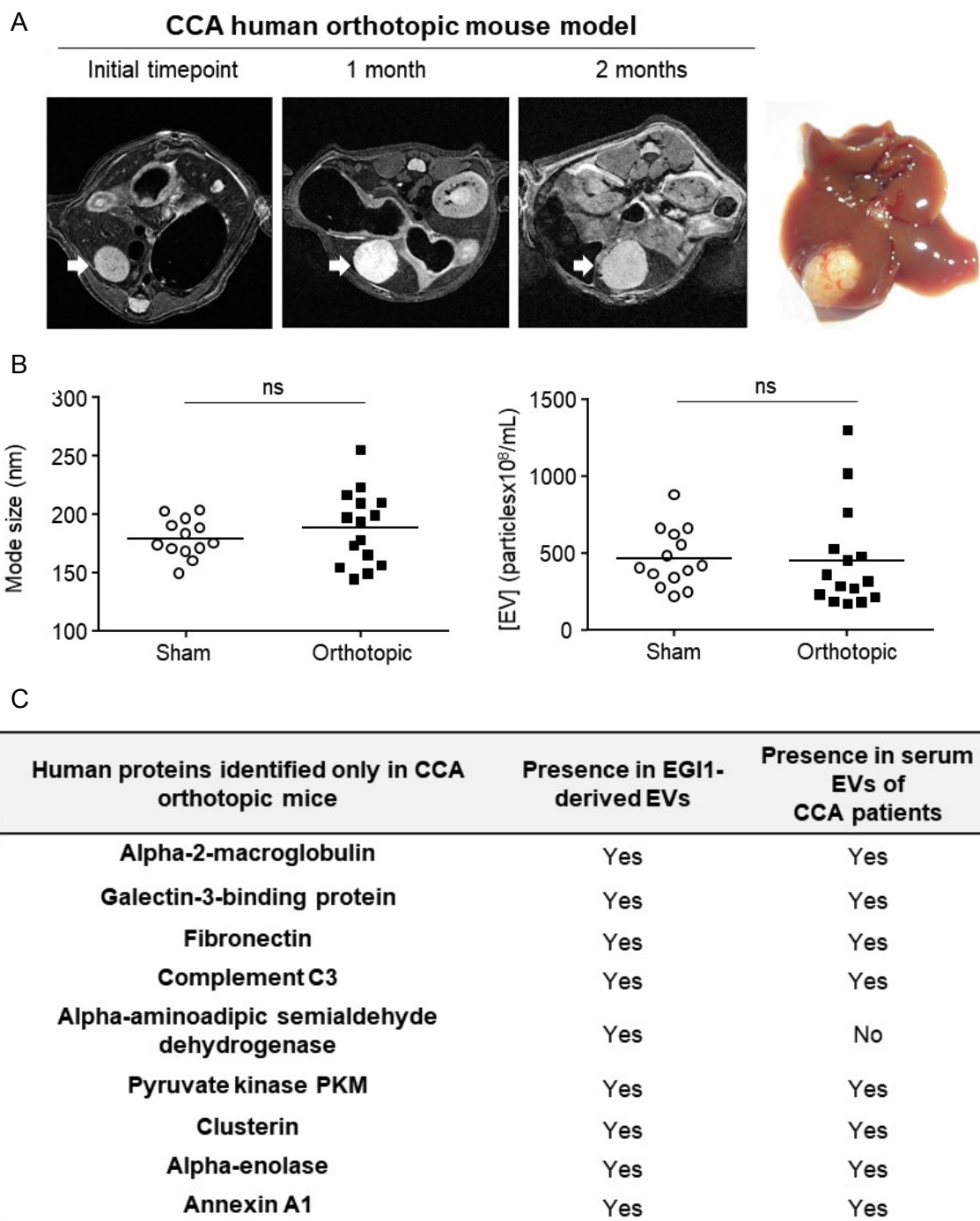


Figura R15. Identificación de proteínas humanas en EVs de suero de ratones inmunodeficientes con implantes orto-tópicos de tumores de CCA humano. A) Imágenes representativas de resonancia magnética nuclear (MRI) de hígados de un ratón tras 1 y 2 meses de la implantación de tumores, e imagen de uno de estos hígados extraídos tras el sacrificio de los animales. B) Determinación de la concentración y tamaño de las EVs de suero de los ratones con y sin los implantes de CCA humano. C) Proteínas de origen humano exclusivamente identificadas en EVs de suero de ratones con implantes tumorales de CCA humano y que son detectadas también en EVs derivadas de células de CCA EGI1 en cultivo

Discusión

Discusión

Las necesidades clínicas del CCA demandan la búsqueda de nuevos biomarcadores no invasivos para un diagnóstico sensible y específico de este tumor, así como nuevas estrategias terapéuticas basadas en el conocimiento de los mecanismos moleculares que promueven su desarrollo y crecimiento. Ante estas necesidades, el presente estudio se centra en la búsqueda de biomarcadores proteicos en EVs presentes en el suero de pacientes con PSC, CCA, HCC e individuos sanos, y en la búsqueda de proteínas oncogénicas en EVs derivadas de las células de CCA capaces de promover el crecimiento de estos tumores.

Estudios previos han investigado la presencia de biomarcadores en bilis, suero y orina de pacientes con CCA mediante análisis por espectrometría de masas (MS)^[144, 170, 171]. Esta técnica proteómica de alto rendimiento se ha convertido en una poderosa herramienta para la búsqueda de nuevos biomarcadores en los últimos años, ya que posibilita la detección y cuantificación de miles de proteínas de una muestra. Sin embargo, mientras que los análisis proteómicos realizados mediante MS en bilis y orina reportaron la presencia de buenos biomarcadores para el CCA, el análisis proteómico del suero total no fue satisfactorio. Probablemente, esto es debido a la alta concentración de las proteínas mayoritarias de suero, lo que produce un aumento en el rango dinámico de estas muestras y, por tanto, que se enmascaren otras proteínas mucho menos abundantes^[144, 170-173]. Para solventar este problema decidimos enfocarnos en una sub-fracción del suero, i.e. las EVs, que contienen biomarcadores para diversas patologías, incluidas las tumorales. En el proceso de aislamiento de esta sub-fracción se consigue retirar una gran parte de las proteínas más abundantes del suero que son solubles y que no precipitan con el aislamiento de las EVs posibilitando así un mejor rendimiento por MS. De este modo, se puso a punto un protocolo de aislamiento de EVs a partir de sólo 1 mL de suero. La caracterización de estas EVs mostró que poseían rasgos morfológicos (forma esférica), de tamaño (~50-200 nm) y moleculares (expresión de marcadores CD9, CD81, CD63, flotitlin-1) típicos de EVs de

pequeño tamaño como microvesículas pequeñas y exosomas. El análisis de la concentración de EVs en suero mostró que los pacientes con HCC presentan un ligero aumento en su concentración, aunque significativo, en comparación con PSC, CCA, e individuos sanos. Este hecho está en concordancia con otros estudios previos en HCC^[145, 146], así como con otros trabajos que han puesto de manifiesto aumentos en la concentración sérica de EVs en diversas patologías incluyendo diabetes, enfermedad renal crónica o hipertensión^[174]. El análisis por MS de las EVs de suero identificó 820 proteínas, así como perfiles proteicos diferentes entre los 4 grupos experimentales. En concreto, se identificaron 95 proteínas diferencialmente expresadas entre CCA vs controles sanos, 161 entre PSC vs controles sanos, 50 entre CCA vs PSC, y 98 entre HCC vs controles sanos. Entre estas proteínas diferencialmente expresadas en CCA vs controles sanos destacan AMPN, VNN1 y PIGR con elevados valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico diferencial. Es importante destacar que AMPN, también conocida como CD13, ha sido sugerida como marcador de células madre cancerígenas en hígado^[175] y que PIGR es una proteína oncogénica involucrada en la inducción de la progresión e invasión tumoral en HCC^[176]. Por otro lado, entre las proteínas diferencialmente expresadas en PSC vs controles sanos destacan AMPN, FCN1 y NEP con elevados valores de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico diferencial. Además, las proteínas FIBG, A1AG1 y S10A8 presentaron elevada sensibilidad y especificidad para el diagnóstico diferencial del CCA vs PSC. Es especialmente destacable el hecho de que las proteínas FCN2, ITIH4 y FIBG (entre otras) presentaron mejores valores para el diagnóstico del CCA temprano (estadios I-II) vs PSC que el CA19-9. Por otro lado, entre las proteínas diferencialmente expresadas en HCC vs controles sanos destacan LG3BP y PIGR, con elevados valores de sensibilidad y especificidad para su diagnóstico; es importante destacar que dichos valores diagnósticos fueron mejores que los que proporcionó el marcador tumoral en suero alfa fetoproteína (AFP), comúnmente utilizada para apoyar el diagnóstico y monitorización del HCC. Hay que remarcar el

hecho de que recientemente se ha descrito que pacientes con HCC por VHB presentan mayores niveles de LG3BP en suero en comparación con individuos sanos, presentando un valor diagnóstico diferencial de AUC de 0,898^[177]. Asimismo, LG3BP se ha propuesto en combinación con el *CD5-like antigen* y la inmunoglobulina J como biomarcadores pronósticos de respuesta a sorafenib^[178]. Por otro lado, los niveles de LG3BP se encontraron aumentados en el plasma de pacientes con HCC por VHC^[179]. En el presente estudio hemos confirmado el enriquecimiento de LG3BP en suero, en concreto en la fracción de EVs, de pacientes con HCC de diferentes etiología, tales como VHB, VHC, etílica e idiopática, apoyando el valor de LG3BP como biomarcador general de HCC. Además, se ha descrito que LG3BP induce la agregación de las células cancerígenas en el torrente sanguíneo, aumento su supervivencia y, por tanto, su capacidad de metástasis^[180], siendo un posible candidato como biomarcador pronóstico y como diana terapéutica en HCC. Por su parte PIGR, como se ha comentado anteriormente, es una proteína oncogénica capaz de promover la progresión tumoral^[176]. Por otro lado, entre las proteínas diferencialmente expresadas entre el iCCA vs HCC destacan FIBG, A1AG1 y VTDB con mayores valores de AUC que CA19-9 y AFP. Estos biomarcadores tienen especial relevancia ya que pueden favorecer el diagnóstico diferencial del iCCA vs HCC mediante métodos no invasivos.

Finalmente, el análisis diferencial de los distintos biomarcadores proteicos entre los 4 grupos de estudio demostró un aumento en la abundancia de VNN1, CRP, FIBG, IGHA1 y A1AG1 en EVs de suero de pacientes con CCA en comparación con PSC, HCC e individuos sanos, poniendo de manifiesto su valor diagnóstico específico para el CCA. Entre estas proteínas, se ha descrito que la elevación de CRP en suero de pacientes con CCA se correlaciona con mal pronóstico en pacientes con tratamiento quimioterápico y en la supervivencia tras resección tumoral^[181-183].

De cara a evaluar la posible transferencia de los resultados a la práctica clínica habitual, analizamos la posibilidad de detectar algunos de los biomarcadores más interesantes (AMPN, PIGR y CRP) mediante *immunoblot* utilizando tanto EVs como

suero total de los pacientes. Nuestros datos demostraron que AMPN, PIGR y CRP se encuentran presentes en EVs y que su abundancia es mayor en pacientes con CCA vs PSC y controles sanos. Esta abundancia relativa en los pacientes con CCA también fue detectada en muestras de suero total. Estos tres marcadores se encontraron enriquecidos en la fracción de EVs, aunque los niveles de CRP son también abundante en la fracción no vesicular. Todos estos datos apoyan la validación de los mejores biomarcadores candidatos en estudios colaborativos internacionales incluyendo un número significativo de pacientes y utilizando técnicas diagnósticas sencillas como ELISA o *immunoblot*.

El valor de las EVs como contenedores de biomarcadores para el diagnóstico del CCA se ha puesto de manifiesto también en los últimos años con otros 2 importantes trabajos. El primero de ellos identificó un panel de miRNAs diferencialmente expresados en EVs de bilis de pacientes con CCA en comparación con individuos control mostrando una destacable capacidad diagnóstica^[144]. En el segundo estudio, nuestro grupo y colaboradores descubrieron que los pacientes con cáncer de hígado (HCC o CCA) presentan un aumento en la concentración de microvesículas en suero con marcadores positivos para Annexin V, EPCAM y ASGPR1 en comparación con pacientes con cirrosis hepática, mostrando un valor diagnóstico de AUC de 0,63. Estos datos sugieren que el análisis de la concentración de estas microvesículas puede ayudar en el diagnóstico precoz del cáncer de hígado en pacientes con cirrosis. Por otro lado, otro estudio reciente ha descrito que los pacientes con estenosis maligna del conducto biliar común por cáncer de páncreas o CCA (estadios III-IV de la enfermedad) presentan un aumento en la concentración de EVs en bilis en comparación con pacientes con estenosis biliar no maligna, mostrando un valor diagnóstico del 100% en bilis y un 63,3% para suero^[147]. Estos prometedores datos, sin embargo, deben ser validados en estudios colaborativos internacionales incluyendo un número mayor de pacientes, así como en pacientes con diferentes estadios de la enfermedad.

En el presente estudio también se compararon las características morfológicas, tamaño y patrón proteico de las EVs secretadas por colangiocitos humanos normales (NHC), colangiocitos humanos inmortalizados no tumorales (H69) y 2 líneas de CCA humano (EGI1 y TFK1). Nuestros datos indicaron que las EVs secretadas por los 4 tipos celulares presentan similar tamaño y morfología, con características típicas de microvesículas de pequeño tamaño o exosomas. Comprobamos que las células de CCA presentaron un aumento de expresión del marcador de EV CD63 en comparación con NHC y H69, lo que sugiere la existencia de posibles alteraciones en el tráfico vesicular y/o una desregulación en su producción. En el análisis proteómico, tanto de los extractos celulares totales como de la fracción de EVs, se identificaron perfiles proteicos similares entre ambas líneas de CCA en comparación con NHC y H69. Además, se comprobó que el perfil proteico de las células H60 (inmortalizadas con el gen oncogénico SV-40) es más parecido a las células de CCA que a los NHC. Por tanto, se descartó el uso de las células H69 para el análisis comparativo entre las líneas de CCA y los colangiocitos humanos normales. Por tanto, el análisis del contenido proteico diferencial entre las EVs secretadas por las células de CCA en comparación con las EVs derivadas de NHC reveló un enriquecimiento en numerosas proteínas oncogénicas en las EVs derivadas de ambas líneas de tumorales. Entre dichas proteínas destacan *epidermal growth factor receptor* (EGFR), *mucin-1*, *integrin beta-4* (ITGB4), *agrin*, *epidermal growth factor receptor kinase substrate 8* (EPS8), *tumor-associated signal transducer 2* (TACSTD2), *CUB domain-containing protein 1* (CDCP1), *disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) y *epithelial cell adhesion molecule* (EPCAM), las cuales se han asociado previamente con la promoción de procesos claves de la tumorigénesis tales como la proliferación, invasión y migración celular. Es importante resaltar que EGFR, ITGB4, agrin, EPCAM, EPS8, TACSTD2 y *mucin-1* se han descrito como factores de mal pronóstico para CCA y su expresión está aumentada en tejido tumoral, apoyando la hipótesis de que las EVs son capaces de reflejar el estado celular. Entre estas proteínas destacan

EFGR, *mucin-1* e ITGB4. EGFR se encuentra aumentadas en CCA promoviendo el crecimiento tumoral, la desdiferenciación celular y la diseminación del tumor mediante el favorecimiento de la invasión y migración de las células tumorales, siendo un factor de mal pronóstico^[61]. *Mucin-1* también se encuentra elevado en tejido de CCA promoviendo la proliferación celular y la metástasis, y su abundancia se ha correlacionado con mal pronóstico^[184, 185]. ITGB4, por tu parte, es una integrina que asociada a exosomas esencial para favorecer la preparación del nicho metastásico^[134].

El análisis bioinformático, mediante *Gene Ontology* e *Ingenuity pathway analysis*, del contenido proteico diferencial entre EVs derivadas de las células de CCA y NHC reveló que dichas proteínas elevadas en EVs de CCA se asocian con procesos de promoción de proliferación e invasión/migración celular. Todos estos datos sugieren que las células de CCA secretan EVs con proteínas oncogénicas capaces de promover procesos carcinogénicos. En este sentido, pudimos comprobar que las EVs secretadas por células de CCA son capaces de promover el crecimiento y migración de colangiocitos humanos normales en cultivo. Estudios futuros son necesarios para determinar el papel de dichas proteínas oncogénicas presentes en las EVs secretadas por células de CCA sobre el desarrollo y crecimiento de estos tumores.

Las EVs presentes en suero pueden ser secretadas por múltiples tipos celulares incluyendo las células tumorales^[186]. Por este motivo, quisimos investigar si EVs secretadas por tumores orto-tópicos de CCA pueden estar presentes y ser detectadas en suero periférico. Para ello, se llevó a cabo un modelo de CCA orto-tópico en ratón mediante la implantación de tumores originados a partir de células de CCA humano para la posterior búsqueda de proteínas específicas humanas presentes en las EVs de suero mediante MS. De este modo, nuestros datos indicaron la presencia de proteínas de origen exclusivamente humano solo en aquellos ratones con implantes tumorales humanos orto-tópicos en comparación con ratones control operados pero sin implantes tumorales. Es importante destacar que varias de estas proteínas humanas identificadas también fueron detectadas en EVs secretadas por las células de CCA

utilizadas para generar los implantes (EG11), así como en EVs de suero de pacientes con CCA. Estos datos apoyan la hipótesis de que EVs secretadas por células de CCA en el hígado pueden ser detectadas en el suero periférico de los pacientes y, en consecuencia, ser posibles biomarcadores de la enfermedad y participar en su patogenia.

En resumen, este estudio pone en evidencia la presencia de proteínas en EVs de suero con valor diagnóstico para PSC, CCA y HCC, siendo potenciales biomarcadores mínimamente invasivos para estas patologías que carecen de buenos métodos de diagnóstico no incruentos. Además, nuestros datos sugieren que las proteínas presentes en EVs derivadas de células de CCA en el hígado podrían ser detectadas en el suero periférico, pudiendo participar en el crecimiento y diseminación del CCA. Estos posibles mecanismos favorecedores de la tumorigénesis del CCA pueden abrir el camino para el desarrollo de nuevas terapias dirigidas al bloqueo de estos procesos, los cuales deberán ser estudiados en profundidad en el futuro.

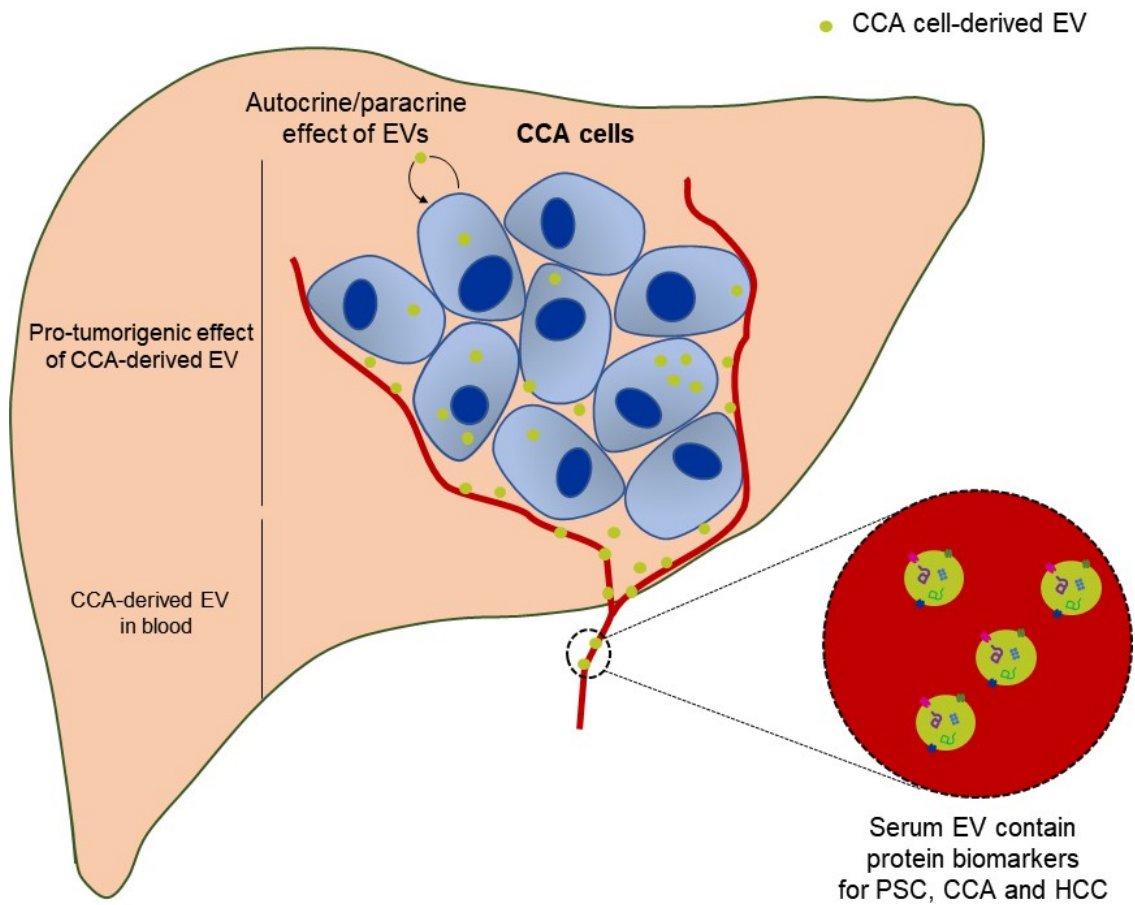
Conclusiones

Conclusiones

1. Los pacientes con PSC, CCA o HCC, y los individuos sanos, contienen en suero EVs con morfología, tamaño y características proteicas típica de exosomas o de microvesículas de pequeño tamaño.
2. Las EVs de suero de pacientes con PSC, CCA o HCC contienen un perfil proteico específico. Algunas de estas proteínas muestran alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico diferencial de dichas enfermedades y pueden ser detectadas mediante *immunoblot* utilizando suero total.
3. Varios de los biomarcadores proteicos identificados mejoran la capacidad diagnóstica del CA19-9 y de la alfa fetoproteína en pacientes con CCA temprano (estadios I-II) en comparación con pacientes con PSC, pacientes con HCC en comparación con individuos sanos, y en pacientes con CCA intrahepático en comparación con pacientes con HCC.
4. Los pacientes con HCC presentan un ligero aumento en la concentración de EVs en suero en comparación con pacientes con PSC, CCA e individuos sanos.
5. Las EVs derivadas de células de CCA en cultivo presentan un enriquecimiento de proteínas oncogénicas, las cuales son importantes en la patogenia del CCA promoviendo la proliferación, invasión y migración celular.
6. Las EVs derivadas de células de CCA en cultivo inducen la proliferación y migración de los colangiocitos humanos normales en cultivo.
7. Los tumores de CCA en el hígado secretan EVs que pueden ser detectadas en suero periférico.

Por tanto, en este estudio se ha puesto de manifiesto la presencia de perfiles proteicos específicos en EVs de suero de pacientes con PSC, CCA y HCC, y de diversas proteínas con valores diagnóstico diferencial para dichas patologías. Por otro lado, se ha descubierto un enriquecimiento de proteínas oncogénicas en EVs

derivadas de células de CCA capaces de favorecer el crecimiento del tumor de forma autocrina/paracrina.



Esquema del papel de las EVs la patogenia del CCA y el diagnóstico de tumores hepatobiliares. Las EVs secretadas por las células de CCA presentan un enriquecimiento de proteínas oncogénicas que podrían estar involucradas en la promoción del crecimiento tumoral y de procesos de invasión y migración. Estas EVs tumorales, además, podrían detectarse en el suero periférico que junto con otras EVs presentes en el suero podrían contener biomarcadores proteicos con alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la PSC, CCA y HCC.

Bibliografía

1. BRANDT, M.F.L.J., *SLEISENGER & FORDTRAN: ENFERMEDADES DIGESTIVAS Y HEPATICAS*. 2008: ELSEVIER. 3114.
2. LaRusso, M.F.a.N.F., *Gastroenterology and Hepatology: Gall Bladder and Bile Ducts*. Vol. 6. 2006.
3. Banales, J.M., et al., *Bicarbonate-rich choleresis induced by secretin in normal rat is taurocholate-dependent and involves AE2 anion exchanger*. *Hepatology*, 2006. **43**(2): p. 266-75.
4. Masyuk, A.I., et al., *Cholangiocyte cilia detect changes in luminal fluid flow and transmit them into intracellular Ca²⁺ and cAMP signaling*. *Gastroenterology*, 2006. **131**(3): p. 911-20.
5. Banales, J.M., et al., *Hepatic cystogenesis is associated with abnormal expression and location of ion transporters and water channels in an animal model of autosomal recessive polycystic kidney disease*. *Am J Pathol*, 2008. **173**(6): p. 1637-46.
6. Gradilone, S.A., et al., *Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(48): p. 19138-43.
7. Masyuk, T.V., et al., *Biliary dysgenesis in the PCK rat, an orthologous model of autosomal recessive polycystic kidney disease*. *Am J Pathol*, 2004. **165**(5): p. 1719-30.
8. Lazaridis, K.N. and N.F. LaRusso, *The Cholangiopathies*. *Mayo Clin Proc*, 2015. **90**(6): p. 791-800.
9. Eaton, J.E., et al., *Pathogenesis of primary sclerosing cholangitis and advances in diagnosis and management*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(3): p. 521-36.
10. O'Hara, S.P., et al., *HIV-1 Tat protein suppresses cholangiocyte toll-like receptor 4 expression and defense against *Cryptosporidium parvum**. *J Infect Dis*, 2009. **199**(8): p. 1195-204.
11. Gevers, T.J. and J.P. Drenth, *Diagnosis and management of polycystic liver disease*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013. **10**(2): p. 101-8.
12. Elborn, J.S., *Cystic fibrosis*. *Lancet*, 2016. **388**(10059): p. 2519-2531.
13. Saleh, M., B.M. Kamath, and D. Chitayat, *Alagille syndrome: clinical perspectives*. *Appl Clin Genet*, 2016. **9**: p. 75-82.
14. Deltenre, P. and D.C. Valla, *Ischemic cholangiopathy*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(3): p. 235-46.
15. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Cholangiocarcinoma*. *Lancet*, 2014. **383**(9935): p. 2168-79.
16. Padda, M.S., et al., *Drug-induced cholestasis*. *Hepatology*, 2011. **53**(4): p. 1377-87.
17. Mack, C.L., A.G. Feldman, and R.J. Sokol, *Clues to the etiology of bile duct injury in biliary atresia*. *Semin Liver Dis*, 2012. **32**(4): p. 307-16.
18. Li, Y., et al., *Cholangitis: a histologic classification based on patterns of injury in liver biopsies*. *Pathol Res Pract*, 2005. **201**(8-9): p. 565-72.
19. Cardinale, V., et al., *Multiple cells of origin in cholangiocarcinoma underlie biological, epidemiological and clinical heterogeneity*. *World J Gastrointest Oncol*, 2012. **4**(5): p. 94-102.
20. Banales, J.M., et al., *Expert consensus document: Cholangiocarcinoma: current knowledge and future perspectives consensus statement from the European Network for the Study of Cholangiocarcinoma (ENS-CCA)*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016. **13**(5): p. 261-80.
21. Rizvi, S. and G.J. Gores, *Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma*. *Gastroenterology*, 2013. **145**(6): p. 1215-29.
22. Nakanuma, Y. and Y. Kakuda, *Pathologic classification of cholangiocarcinoma: New concepts*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015. **29**(2): p. 277-93.
23. Blechacz, B., et al., *Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011. **8**(9): p. 512-22.

24. Yamasaki, S., *Intrahepatic cholangiocarcinoma: macroscopic type and stage classification*. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2003. **10**(4): p. 288-91.
25. Nakanuma, Y., et al., *Pathological classification of intrahepatic cholangiocarcinoma based on a new concept*. World J Hepatol, 2010. **2**(12): p. 419-27.
26. Aishima, S. and Y. Oda, *Pathogenesis and classification of intrahepatic cholangiocarcinoma: different characters of perihilar large duct type versus peripheral small duct type*. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015. **22**(2): p. 94-100.
27. Komuta, M., et al., *Histological diversity in cholangiocellular carcinoma reflects the different cholangiocyte phenotypes*. Hepatology, 2012. **55**(6): p. 1876-88.
28. Hirschfield, G.M., et al., *Primary sclerosing cholangitis*. Lancet, 2013. **382**(9904): p. 1587-99.
29. Weismuller, T.J., et al., *The challenges in primary sclerosing cholangitis--aetiopathogenesis, autoimmunity, management and malignancy*. J Hepatol, 2008. **48 Suppl 1**: p. S38-57.
30. Razumilava, N. and G.J. Gores, *Surveillance for Cholangiocarcinoma in Patients with Primary Sclerosing Cholangitis: Effective and Justified?* Clin Liver Dis (Hoboken), 2016. **8**(2): p. 43-47.
31. Tyson, G.L. and H.B. El-Serag, *Risk factors for cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2011. **54**(1): p. 173-84.
32. Chapman, R.W., *Risk factors for biliary tract carcinogenesis*. Ann Oncol, 1999. **10 Suppl 4**: p. 308-11.
33. Huang, M.H., et al., *Relation of hepatolithiasis to helminthic infestation*. J Gastroenterol Hepatol, 2005. **20**(1): p. 141-6.
34. Erice, O., et al., *Molecular Mechanisms of Cholangiocarcinogenesis: New Potential Targets for Therapy*. Curr Drug Targets, 2017. **18**(8): p. 932-949.
35. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
36. Zou, S., et al., *Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5696.
37. Ong, C.K., et al., *Exome sequencing of liver fluke-associated cholangiocarcinoma*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 690-3.
38. Nakamura, H., et al., *Genomic spectra of biliary tract cancer*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 1003-10.
39. Borad, M.J., et al., *Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma*. PLoS Genet, 2014. **10**(2): p. e1004135.
40. Fujimoto, A., et al., *Whole-genome mutational landscape of liver cancers displaying biliary phenotype reveals hepatitis impact and molecular diversity*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6120.
41. Boulter, L., et al., *WNT signaling drives cholangiocarcinoma growth and can be pharmacologically inhibited*. J Clin Invest, 2015. **125**(3): p. 1269-85.
42. Jiao, Y., et al., *Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1470-1473.
43. Chan-On, W., et al., *Exome sequencing identifies distinct mutational patterns in liver fluke-related and non-infection-related bile duct cancers*. Nat Genet, 2013. **45**(12): p. 1474-8.
44. Saha, S.K., et al., *Corrigendum: Mutant IDH inhibits HNF-4alpha to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer*. Nature, 2015. **528**(7580): p. 152.
45. Borger, D.R., et al., *Frequent mutation of isocitrate dehydrogenase (IDH)1 and IDH2 in cholangiocarcinoma identified through broad-based tumor genotyping*. Oncologist, 2012. **17**(1): p. 72-9.

46. Goeppert, B., et al., *Global alterations of DNA methylation in cholangiocarcinoma target the Wnt signaling pathway*. Hepatology, 2014. **59**(2): p. 544-54.
47. He, J.C., et al., *TACC3 overexpression in cholangiocarcinoma correlates with poor prognosis and is a potential anti-cancer molecular drug target for HDAC inhibitors*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 75441-75456.
48. Alvaro, D., et al., *Estrogens and insulin-like growth factor 1 modulate neoplastic cell growth in human cholangiocarcinoma*. Am J Pathol, 2006. **169**(3): p. 877-88.
49. Isse, K., et al., *Estrogen stimulates female biliary epithelial cell interleukin-6 expression in mice and humans*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 869-80.
50. Mancino, A., et al., *Estrogens stimulate the proliferation of human cholangiocarcinoma by inducing the expression and secretion of vascular endothelial growth factor*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(2): p. 156-63.
51. Alpini, G., et al., *Serotonin metabolism is dysregulated in cholangiocarcinoma, which has implications for tumor growth*. Cancer Res, 2008. **68**(22): p. 9184-93.
52. Coufal, M., et al., *Increased local dopamine secretion has growth-promoting effects in cholangiocarcinoma*. Int J Cancer, 2010. **126**(9): p. 2112-22.
53. Fava, G., et al., *Leptin enhances cholangiocarcinoma cell growth*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6752-61.
54. Marzioni, M., et al., *Human cholangiocarcinoma development is associated with dysregulation of opiodergic modulation of cholangiocyte growth*. Dig Liver Dis, 2009. **41**(7): p. 523-33.
55. DeMorrow, S., et al., *Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth: recruitment of Fas and Fas ligand to lipid rafts*. J Biol Chem, 2007. **282**(17): p. 13098-113.
56. Frampton, G., et al., *Opposing actions of endocannabinoids on cholangiocarcinoma growth is via the differential activation of Notch signaling*. Exp Cell Res, 2010. **316**(9): p. 1465-78.
57. Harder, J., et al., *EGFR and HER2 expression in advanced biliary tract cancer*. World J Gastroenterol, 2009. **15**(36): p. 4511-7.
58. Yoshikawa, D., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2008. **98**(2): p. 418-25.
59. Miyamoto, M., et al., *Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 131-8.
60. Terada, T., Y. Nakanuma, and A.E. Sirica, *Immunohistochemical demonstration of MET overexpression in human intrahepatic cholangiocarcinoma and in hepatolithiasis*. Hum Pathol, 1998. **29**(2): p. 175-80.
61. Claperon, A., et al., *EGF/EGFR axis contributes to the progression of cholangiocarcinoma through the induction of an epithelial-mesenchymal transition*. J Hepatol, 2014. **61**(2): p. 325-32.
62. Gwak, G.Y., et al., *Detection of response-predicting mutations in the kinase domain of the epidermal growth factor receptor gene in cholangiocarcinomas*. J Cancer Res Clin Oncol, 2005. **131**(10): p. 649-52.
63. Nakazawa, K., et al., *Amplification and overexpression of c-erbB-2, epidermal growth factor receptor, and c-met in biliary tract cancers*. J Pathol, 2005. **206**(3): p. 356-65.
64. Menakongka, A. and T. Suthiphongchai, *Involvement of PI3K and ERK1/2 pathways in hepatocyte growth factor-induced cholangiocarcinoma cell invasion*. World J Gastroenterol, 2010. **16**(6): p. 713-22.
65. Lozano, E., et al., *Cocarcinogenic effects of intrahepatic bile acid accumulation in cholangiocarcinoma development*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(1): p. 91-100.
66. Werneburg, N.W., et al., *Bile acids activate EGF receptor via a TGF-alpha-dependent mechanism in human cholangiocyte cell lines*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(1): p. G31-6.

67. Dai, J., et al., *Impact of bile acids on the growth of human cholangiocarcinoma via FXR*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 41.
68. Liu, R., et al., *Conjugated bile acids promote cholangiocarcinoma cell invasive growth through activation of sphingosine 1-phosphate receptor 2*. Hepatology, 2014. **60**(3): p. 908-18.
69. Maroni, L., G. Alpini, and M. Marziani, *Cholangiocarcinoma development: the resurgence of bile acids*. Hepatology, 2014. **60**(3): p. 795-7.
70. Sekiya, S. and A. Suzuki, *Intrahepatic cholangiocarcinoma can arise from Notch-mediated conversion of hepatocytes*. J Clin Invest, 2012. **122**(11): p. 3914-8.
71. Huntzicker, E.G., et al., *Differential effects of targeting Notch receptors in a mouse model of liver cancer*. Hepatology, 2015. **61**(3): p. 942-52.
72. Fingas, C.D., et al., *Myofibroblast-derived PDGF-BB promotes Hedgehog survival signaling in cholangiocarcinoma cells*. Hepatology, 2011. **54**(6): p. 2076-88.
73. Razumilava, N., et al., *Non-canonical Hedgehog signaling contributes to chemotaxis in cholangiocarcinoma*. J Hepatol, 2014. **60**(3): p. 599-605.
74. Sia, D., et al., *Integrative molecular analysis of intrahepatic cholangiocarcinoma reveals 2 classes that have different outcomes*. Gastroenterology, 2013. **144**(4): p. 829-40.
75. Park, J., et al., *Inhibition of interleukin 6-mediated mitogen-activated protein kinase activation attenuates growth of a cholangiocarcinoma cell line*. Hepatology, 1999. **30**(5): p. 1128-33.
76. Wehbe, H., et al., *Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10517-24.
77. Araki, K., et al., *E/N-cadherin switch mediates cancer progression via TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in extrahepatic cholangiocarcinoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(12): p. 1885-93.
78. Sato, Y., et al., *Epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor- β 1/Snail activation aggravates invasive growth of cholangiocarcinoma*. Am J Pathol, 2010. **177**(1): p. 141-52.
79. Han, C., et al., *Cyclooxygenase-2 promotes human cholangiocarcinoma growth: evidence for cyclooxygenase-2-independent mechanism in celecoxib-mediated induction of p21waf1/cip1 and p27kip1 and cell cycle arrest*. Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1369-76.
80. Zhang, Z., G.H. Lai, and A.E. Sirica, *Celecoxib-induced apoptosis in rat cholangiocarcinoma cells mediated by Akt inactivation and Bax translocation*. Hepatology, 2004. **39**(4): p. 1028-37.
81. Jaiswal, M., et al., *Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism*. Cancer Res, 2000. **60**(1): p. 184-90.
82. Jaiswal, M., et al., *Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes*. Gastroenterology, 2001. **120**(1): p. 190-9.
83. Sirica, A.E. and G.J. Gores, *Desmoplastic stroma and cholangiocarcinoma: clinical implications and therapeutic targeting*. Hepatology, 2014. **59**(6): p. 2397-402.
84. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer Cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
85. Junttila, M.R. and F.J. de Sauvage, *Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response*. Nature, 2013. **501**(7467): p. 346-54.
86. Sulpice, L., et al., *Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma*. Hepatology, 2013. **58**(6): p. 1992-2000.

87. Andersen, J.B., et al., *Genomic and genetic characterization of cholangiocarcinoma identifies therapeutic targets for tyrosine kinase inhibitors*. *Gastroenterology*, 2012. **142**(4): p. 1021-1031 e15.
88. Navaneethan, U., et al., *Comparative effectiveness of biliary brush cytology and intraductal biopsy for detection of malignant biliary strictures: a systematic review and meta-analysis*. *Gastrointest Endosc*, 2015. **81**(1): p. 168-76.
89. Venkatesh, P.G., et al., *Increased serum levels of carbohydrate antigen 19-9 and outcomes in primary sclerosing cholangitis patients without cholangiocarcinoma*. *Dig Dis Sci*, 2013. **58**(3): p. 850-7.
90. Sinakos, E., et al., *Many patients with primary sclerosing cholangitis and increased serum levels of carbohydrate antigen 19-9 do not have cholangiocarcinoma*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2011. **9**(5): p. 434-9 e1.
91. Levy, C., et al., *The value of serum CA 19-9 in predicting cholangiocarcinomas in patients with primary sclerosing cholangitis*. *Dig Dis Sci*, 2005. **50**(9): p. 1734-40.
92. Rosen, C.B., J.K. Heimbach, and G.J. Gores, *Liver transplantation for cholangiocarcinoma*. *Transpl Int*, 2010. **23**(7): p. 692-7.
93. Khan, S.A., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of cholangiocarcinoma: an update*. *Gut*, 2012. **61**(12): p. 1657-69.
94. Martin, R.C., 2nd, et al., *Cost comparison of endoscopic stenting vs surgical treatment for unresectable cholangiocarcinoma*. *Surg Endosc*, 2002. **16**(4): p. 667-70.
95. Tsukiyama, I., et al., *A Cost-Effectiveness Analysis of Gemcitabine plus Cisplatin Versus Gemcitabine Alone for Treatment of Advanced Biliary Tract Cancer in Japan*. *J Gastrointest Cancer*, 2016.
96. Valle, J.W., et al., *Cisplatin and gemcitabine for advanced biliary tract cancer: a meta-analysis of two randomised trials*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(2): p. 391-8.
97. Lamarca, A., et al., *Second-line chemotherapy in advanced biliary cancer: a systematic review*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(12): p. 2328-38.
98. Rizvi, S., et al., *Cholangiocarcinoma: molecular pathways and therapeutic opportunities*. *Semin Liver Dis*, 2014. **34**(4): p. 456-64.
99. Yao, L., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids Upregulate 15-PGDH Expression in Cholangiocarcinoma Cells by Inhibiting miR-26a/b Expression*. *Cancer Res*, 2015. **75**(7): p. 1388-98.
100. Zhang, J., et al., *miR-21 Inhibition Reduces Liver Fibrosis and Prevents Tumor Development by Inducing Apoptosis of CD24+ Progenitor Cells*. *Cancer Res*, 2015. **75**(9): p. 1859-67.
101. Saborowski, A., et al., *Mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma validates FIG-ROS as a potent fusion oncogene and therapeutic target*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(48): p. 19513-8.
102. Wu, Y.M., et al., *Identification of targetable FGFR gene fusions in diverse cancers*. *Cancer Discov*, 2013. **3**(6): p. 636-47.
103. Mertens, J.C., et al., *Therapeutic effects of deleting cancer-associated fibroblasts in cholangiocarcinoma*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 897-907.
104. Raposo, G. and W. Stoorvogel, *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. *J Cell Biol*, 2013. **200**(4): p. 373-83.
105. Huotari, J. and A. Helenius, *Endosome maturation*. *EMBO J*, 2011. **30**(17): p. 3481-500.
106. Akers, J.C., et al., *Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies*. *J Neurooncol*, 2013. **113**(1): p. 1-11.
107. Gyorgy, B., et al., *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. *Cell Mol Life Sci*, 2011. **68**(16): p. 2667-88.
108. Olaizola, P., et al., *MicroRNAs and extracellular vesicles in cholangiopathies*. *Biochim Biophys Acta*, 2017.

109. Yanez-Mo, M., et al., *Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 27066.
110. Keller, S., et al., *Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 86.
111. Robbins, P.D. and A.E. Morelli, *Regulation of immune responses by extracellular vesicles*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(3): p. 195-208.
112. Adam, S., et al., *Review: Fetal-maternal communication via extracellular vesicles - Implications for complications of pregnancies*. Placenta, 2017. **54**: p. 83-88.
113. Teixeira, J.H., et al., *Circulating extracellular vesicles: Their role in tissue repair and regeneration*. Transfus Apher Sci, 2016. **55**(1): p. 53-61.
114. Katsuda, T. and T. Ochiya, *Molecular signatures of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicle-mediated tissue repair*. Stem Cell Res Ther, 2015. **6**: p. 212.
115. Hirsova, P., et al., *Extracellular vesicles in liver pathobiology: Small particles with big impact*. Hepatology, 2016. **64**(6): p. 2219-2233.
116. Masyuk, A.I., et al., *Biliary exosomes influence cholangiocyte regulatory mechanisms and proliferation through interaction with primary cilia*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(4): p. G990-9.
117. Tomiyama, T., et al., *The modulation of co-stimulatory molecules by circulating exosomes in primary biliary cirrhosis*. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(3): p. 276-284.
118. Poupon, R., *Primary biliary cirrhosis: a 2010 update*. J Hepatol, 2010. **52**(5): p. 745-58.
119. Lleo, A., et al., *Shotgun proteomics: identification of unique protein profiles of apoptotic bodies from biliary epithelial cells*. Hepatology, 2014. **60**(4): p. 1314-23.
120. Gutwein, P., et al., *Cleavage of L1 in exosomes and apoptotic membrane vesicles released from ovarian carcinoma cells*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(7): p. 2492-501.
121. Kogure, T., et al., *Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth*. Hepatology, 2011. **54**(4): p. 1237-48.
122. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 619-24.
123. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
124. Khan, S., et al., *Extracellular, cell-permeable survivin inhibits apoptosis while promoting proliferative and metastatic potential*. Br J Cancer, 2009. **100**(7): p. 1073-86.
125. Xiao, D., et al., *Melanoma cell-derived exosomes promote epithelial-mesenchymal transition in primary melanocytes through paracrine/autocrine signaling in the tumor microenvironment*. Cancer Lett, 2016. **376**(2): p. 318-27.
126. Harris, D.A., et al., *Exosomes released from breast cancer carcinomas stimulate cell movement*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0117495.
127. Haga, H., et al., *Tumour cell-derived extracellular vesicles interact with mesenchymal stem cells to modulate the microenvironment and enhance cholangiocarcinoma growth*. J Extracell Vesicles, 2015. **4**: p. 24900.
128. Mu, W., S. Rana, and M. Zoller, *Host matrix modulation by tumor exosomes promotes motility and invasiveness*. Neoplasia, 2013. **15**(8): p. 875-87.
129. Bouvy, C., et al., *Contributing role of extracellular vesicles on vascular endothelium haemostatic balance in cancer*. J Extracell Vesicles, 2014. **3**.
130. Grange, C., et al., *Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche*. Cancer Res, 2011. **71**(15): p. 5346-56.
131. Shao, H., et al., *Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6999.

132. Corcoran, C., et al., *Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e50999.
133. Chen, W.X., et al., *Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e95240.
134. Hoshino, A., et al., *Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis*. Nature, 2015. **527**(7578): p. 329-35.
135. Peinado, H., et al., *Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET*. Nat Med, 2012. **18**(6): p. 883-91.
136. Chalmin, F., et al., *Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells*. J Clin Invest, 2010. **120**(2): p. 457-71.
137. Valenti, R., et al., *Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes*. Cancer Res, 2006. **66**(18): p. 9290-8.
138. Klibi, J., et al., *Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1957-66.
139. Li, L., et al., *Extracellular vesicles carry microRNA-195 to intrahepatic cholangiocarcinoma and improve survival in a rat model*. Hepatology, 2017. **65**(2): p. 501-514.
140. Katsuda, T., N. Kosaka, and T. Ochiya, *The roles of extracellular vesicles in cancer biology: toward the development of novel cancer biomarkers*. Proteomics, 2014. **14**(4-5): p. 412-25.
141. Chen, J.H., et al., *Cholangiocarcinoma-derived exosomes inhibit the antitumor activity of cytokine-induced killer cells by down-regulating the secretion of tumor necrosis factor-alpha and perforin*. J Zhejiang Univ Sci B, 2016. **17**(7): p. 537-44.
142. Dutta, S., et al., *Proteomics profiling of cholangiocarcinoma exosomes: A potential role of oncogenic protein transferring in cancer progression*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1852**(9): p. 1989-99.
143. Chaiyadet, S., et al., *Carcinogenic Liver Fluke Secretes Extracellular Vesicles That Promote Cholangiocytes to Adopt a Tumorigenic Phenotype*. J Infect Dis, 2015. **212**(10): p. 1636-45.
144. Li, L., et al., *Human bile contains microRNA-laden extracellular vesicles that can be used for cholangiocarcinoma diagnosis*. Hepatology, 2014. **60**(3): p. 896-907.
145. Julich-Haertel, H., et al., *Cancer-associated circulating large extracellular vesicles in cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2017. **67**(2): p. 282-292.
146. Brodsky, S.V., et al., *Dynamics of circulating microparticles in liver transplant patients*. J Gastrointest Liver Dis, 2008. **17**(3): p. 261-8.
147. Severino, V., et al., *Extracellular Vesicles in Bile as Markers of Malignant Biliary Stenoses*. Gastroenterology, 2017. **153**(2): p. 495-504 e8.
148. Bobrie, A., et al., *Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression*. Cancer Res, 2012. **72**(19): p. 4920-30.
149. Savina, A., et al., *Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 20083-90.
150. Marleau, A.M., et al., *Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer*. J Transl Med, 2012. **10**: p. 134.
151. Al-Nedawi, K., et al., *Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3794-9.

152. Atai, N.A., et al., *Heparin blocks transfer of extracellular vesicles between donor and recipient cells*. J Neurooncol, 2013. **115**(3): p. 343-51.
153. Escudier, B., et al., *Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes: results of the first phase I clinical trial*. J Transl Med, 2005. **3**(1): p. 10.
154. Morse, M.A., et al., *A phase I study of dexosome immunotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer*. J Transl Med, 2005. **3**(1): p. 9.
155. Sun, D., et al., *A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes*. Mol Ther, 2010. **18**(9): p. 1606-14.
156. European Association for the Study of the Liver, *EASL Clinical Practice Guidelines: management of cholestatic liver diseases*. J Hepatol, 2009. **51**(2): p. 237-67.
157. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Ann Surg Oncol, 2010. **17**(6): p. 1471-4.
158. Banales, J.M., et al., *Up-regulation of microRNA 506 leads to decreased Cl⁻/HCO₃⁻ anion exchanger 2 expression in biliary epithelium of patients with primary biliary cirrhosis*. Hepatology, 2012. **56**(2): p. 687-97.
159. Munoz-Garrido, P., et al., *Ursodeoxycholic acid inhibits hepatic cystogenesis in experimental models of polycystic liver disease*. J Hepatol, 2015. **63**(4): p. 952-61.
160. Urribarri, A.D., et al., *Inhibition of metalloprotease hyperactivity in cystic cholangiocytes halts the development of polycystic liver diseases*. Gut, 2014. **63**(10): p. 1658-67.
161. Raposo, G., et al., *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 1161-72.
162. Salter, K.D., et al., *Modified culture conditions enhance expression of differentiated phenotypic properties of normal rat cholangiocytes*. Lab Invest, 2000. **80**(11): p. 1775-8.
163. Uriarte, I., et al., *Bicarbonate secretion of mouse cholangiocytes involves Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransport in addition to Na⁽⁺⁾-independent Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ exchange*. Hepatology, 2010. **51**(3): p. 891-902.
164. Dragovic, R.A., et al., *Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis*. Nanomedicine, 2011. **7**(6): p. 780-8.
165. Wisniewski, J.R., A. Zougman, and M. Mann, *Combination of FASP and StageTip-based fractionation allows in-depth analysis of the hippocampal membrane proteome*. J Proteome Res, 2009. **8**(12): p. 5674-8.
166. Yeung, Y.G. and E.R. Stanley, *Rapid detergent removal from peptide samples with ethyl acetate for mass spectrometry analysis*. Curr Protoc Protein Sci, 2010. **Chapter 16**: p. Unit 16 12.
167. Huang da, W., et al., *Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID*. Curr Protoc Bioinformatics, 2009. **Chapter 13**: p. Unit 13 11.
168. Huang da, W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 44-57.
169. Cory, G., *Scratch-wound assay*. Methods Mol Biol, 2011. **769**: p. 25-30.
170. Lankisch, T.O., et al., *Bile proteomic profiles differentiate cholangiocarcinoma from primary sclerosing cholangitis and choledocholithiasis*. Hepatology, 2011. **53**(3): p. 875-84.
171. Metzger, J., et al., *Urine proteomic analysis differentiates cholangiocarcinoma from primary sclerosing cholangitis and other benign biliary disorders*. Gut, 2013. **62**(1): p. 122-30.
172. Aebersold, R. and M. Mann, *Mass spectrometry-based proteomics*. Nature, 2003. **422**(6928): p. 198-207.

173. Domon, B. and R. Aebersold, *Mass spectrometry and protein analysis*. Science, 2006. **312**(5771): p. 212-7.
174. Burger, D., et al., *Microparticles: biomarkers and beyond*. Clin Sci (Lond), 2013. **124**(7): p. 423-41.
175. Colvin, H. and M. Mori, *Getting to the heart of the matter in cancer: Novel approaches to targeting cancer stem cells*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2017. **93**(3): p. 146-154.
176. Yue, X., et al., *Polymeric immunoglobulin receptor promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2017. **65**(6): p. 1948-1962.
177. Liu, T., et al., *Discovering potential serological biomarker for chronic Hepatitis B Virus-related hepatocellular carcinoma in Chinese population by MAL-associated serum glycoproteomics analysis*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 38918.
178. Kim, H., et al., *Prediction of Response to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma: A Putative Marker Panel by Multiple Reaction Monitoring-Mass Spectrometry (MRM-MS)*. Mol Cell Proteomics, 2017. **16**(7): p. 1312-1323.
179. Ferrin, G., et al., *Identification of candidate biomarkers for hepatocellular carcinoma in plasma of HCV-infected cirrhotic patients by 2-D DIGE*. Liver Int, 2014. **34**(3): p. 438-46.
180. Lin, T.W., et al., *Galectin-3 Binding Protein and Galectin-1 Interaction in Breast Cancer Cell Aggregation and Metastasis*. J Am Chem Soc, 2015. **137**(30): p. 9685-93.
181. Gerhardt, T., et al., *C-reactive protein is a prognostic indicator in patients with perihilar cholangiocarcinoma*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(34): p. 5495-500.
182. Lin, Z.Y., et al., *Intrahepatic cholangiocarcinoma prognostic determination using pre-operative serum C-reactive protein levels*. BMC Cancer, 2016. **16**(1): p. 792.
183. Saisho, T., et al., *Prognostic factors in patients with advanced biliary tract cancer receiving chemotherapy*. Hepatogastroenterology, 2005. **52**(66): p. 1654-8.
184. Sasaki, M., et al., *Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 and MUC1 may be related to malignant behaviour in intraductal papillary neoplasm of the bile duct*. Histopathology, 2013. **62**(3): p. 446-57.
185. Tamada, S., et al., *MUC4 is a novel prognostic factor of extrahepatic bile duct carcinoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(14 Pt 1): p. 4257-64.
186. Azmi, A.S., B. Bao, and F.H. Sarkar, *Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review*. Cancer Metastasis Rev, 2013. **32**(3-4): p. 623-42.