

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A
TAXANOS EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO.
ESTUDIO DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS.**

NEREA GESTOSO UZAL

2024



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA



El Prof. Dr. **ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

El Prof. Dr. **JUAN JESÚS CRUZ HERNÁNDEZ**, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

CERTIFICAN

Que el trabajo titulado **"IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES DE RESISTENCIA A TAXANOS EN CÁNCER DE CABEZA Y CUELLO. ESTUDIO DE ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS."**, presentado por la Graduada en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, **Dña. NEREA GESTOSO UZAL**, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Medicina y reúne, a su juicio, todos los requisitos necesarios para ser presentado ante el tribunal correspondiente a fin de optar al Grado de Doctor de la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Salamanca, a 16 de abril de 2024.

Prof. Dr. Rogelio González Sarmiento

Prof. Dr. Juan Jesús Cruz Hernández

Nerea Gestoso Uzal ha realizado este trabajo de tesis doctoral siendo beneficiaria de un contrato predoctoral del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL) desde el 1 de junio hasta el 30 de agosto de 2020; y de un contrato predoctoral de la Junta de Castilla y León cofinanciado por el Fondo Social Europeo desde el 1 de septiembre de 2020 hasta el 31 de mayo de 2024.

La doctoranda realizó parte del presente trabajo durante una estancia de investigación de tres meses de duración, entre septiembre y diciembre de 2023, en el laboratorio *Cancer Drug Resistance*, dirigido por la Prof. Dra. Helena Vasconcelos, en el Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (i3S) (Oporto, Portugal).

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III mediante el proyecto PI18/01476.

Esta se trata de una versión reducida y fidedigna de la tesis doctoral en la que se han suprimido aquellos aspectos sometidos a algún conflicto de interés.

A mis abuelos, Manolo y Lino

**“Dende aquí vexo un camiño
que non sei a donde vai
polo mesmo que n’o sei
quixera o poder andar”**

Rosalía de Castro

RESUMEN

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello incluye un grupo heterogéneo de neoplasias con origen en el epitelio escamoso del tracto aerodigestivo superior. Una de las opciones terapéuticas cuando el tumor es irresecable y se diagnostica en estadios localmente avanzados es la quimioterapia de inducción con platinos, taxanos y 5-FU (régimen TPF) seguida de radioterapia. A pesar de la mejora en la supervivencia observada en los últimos años, existen subgrupos de pacientes que presentan resistencia al tratamiento y mal pronóstico.

Por este motivo, el objetivo principal de este trabajo fue caracterizar las alteraciones moleculares asociadas al carcinoma escamoso de cabeza y cuello resistente a taxanos. Se emplearon tres líneas celulares derivadas de carcinomas escamosos de lengua (CAL33), de laringe (32860) y de orofaringe (32816) y se indujo la resistencia a paclitaxel mediante el incremento progresivo de dosis, estableciéndose dos líneas celulares resistentes a taxanos (CAL33-R y 32816-R). Sin embargo, la línea celular 32860 no adquirió resistencia a paclitaxel. Esta línea celular presenta una delección en la región terminal del brazo cromosómico 3p que afecta al gen *ATG7* y una inhibición del proceso de autofagia. Con el objetivo de determinar si esta alteración era responsable de la ausencia de adquisición de resistencia a paclitaxel, se inactivó el gen *ATG7* en la línea celular 32816 mediante la tecnología CRISPR-Cas9, generando clones *knockout* para *ATG7*. En estos clones se observó un bloqueo de la autofagia, una menor sensibilidad a paclitaxel y una adquisición de resistencia a paclitaxel más rápida. De este modo, la inactivación de *ATG7* causa un bloqueo de la autofagia, pero no es la responsable del comportamiento diferencial observado en la línea celular 32860.

Se definió el perfil genómico de una serie de 177 carcinomas escamosos de cabeza y cuello diagnosticados en estadios localmente avanzados y se asociaron las alteraciones encontradas con la respuesta al régimen TPF. Los tumores de los pacientes con toxicidad al tratamiento presentaron un mayor número de cambios genómicos. Las pérdidas en 4p fueron más frecuentes en este grupo, sugiriendo que esta alteración podría determinar la toxicidad a la terapia TPF. Además, se analizó la región 3p25.3, donde se encuentra el gen *ATG7*, y se identificaron delecciones en un 64,4% de los casos en la serie global, de modo que esta es una alteración recurrente en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello.

Por otra parte, en las líneas celulares CAL33-R y 32816-R se identificó la sobreexpresión de *ABCB1*, que codifica MDR1, una bomba de expulsión de fármacos,

y la infraexpresión de *DNAJC15*, que codifica MCJ, un regulador negativo de la respiración mitocondrial. Se demostró que estas alteraciones son esenciales para la resistencia a taxanos en estas líneas celulares, identificando así un posible biomarcador de respuesta conjunto. La caracterización del fenotipo de las líneas celulares CAL33-R y 32816-R reveló una disminución de la proliferación y un aumento de la capacidad migratoria. Además, se analizó el papel de las vesículas extracelulares en la resistencia a taxanos. Se identificaron diferencias en el contenido proteico de las vesículas liberadas por las líneas celulares CAL33 y CAL33-R, que ponen de manifiesto la posible transferencia de la resistencia a otras células tumorales mediante este mecanismo.

Finalmente, se estudió la respuesta de las líneas celulares resistentes a taxanos a otras terapias. Estas líneas celulares mantuvieron la respuesta a 5-FU y mostraron un incremento de sensibilidad a agentes inductores de daño en el DNA, incluyendo el cisplatino y la radiación. El motivo de esta sensibilidad cruzada es un aumento en los niveles de daño en el DNA junto con alteraciones en las vías de reparación de este daño. Teniendo en cuenta esto, se estudió la respuesta a olaparib, un inhibidor de la reparación del daño en el DNA y se observó que las células resistentes a taxanos también mostraban una mayor sensibilidad a este fármaco.

Los resultados obtenidos sugieren que *ATG7* podría condicionar la respuesta a taxanos en carcinoma escamoso de cabeza y cuello. Además, la sobreexpresión de *ABCB1* junto con la infraexpresión de *DNAJC15* podría ser un biomarcador predictivo de la respuesta a taxanos, determinando la existencia de resistencia al tratamiento. El mecanismo subyacente a esta resistencia podría basarse en un aumento de la producción de ATP mitocondrial, debido a la pérdida de expresión de *DNAJC15*, que podría ser empleado por la bomba de eflujo MDR1, capaz de expulsar el fármaco reduciendo la concentración intracelular y el efecto del mismo. La combinación de agentes inductores de daño en el DNA con inhibidores de la reparación es una estrategia terapéutica prometedora en el CECC resistente a taxanos.

SUMMARY

Squamous cell carcinoma of the head and neck includes a heterogeneous group of neoplasms originated in the squamous epithelium of the upper aerodigestive tract. One of the therapeutic options for unresectable tumours diagnosed in locally advanced stages is induction chemotherapy with taxanes, platinum and 5-fluorouracil (TPF regimen) followed by radiotherapy. Despite the improvement in survival observed in recent years, there are subgroups of patients who present resistance to treatment and poor prognosis.

For this reason, the main objective of this work was to characterize the molecular alterations associated with taxane-resistant head and neck squamous cell carcinoma. Paclitaxel resistance was induced in three cell lines derived from squamous carcinomas of the tongue (CAL33), larynx (32860) and oropharynx (32816) by step-wise dose increase, establishing two taxane-resistant cell lines (CAL33-R and 32816-R). However, the 32860 cell line did not acquire resistance to paclitaxel. This cell line presents a deletion in the terminal region of chromosome arm 3p that affects the *ATG7* gene and causes an inhibition of autophagy. In order to determine whether this alteration was responsible for the lack of acquisition of paclitaxel resistance, the *ATG7* gene was inactivated in the 32816 cell line using CRISPR-Cas9 technology, generating *ATG7* knockout clones. In these clones, autophagy blockade, decreased sensitivity to paclitaxel and faster acquisition of paclitaxel resistance were observed. Thus, inactivation of *ATG7* inhibits autophagy, but is not responsible for the differential behaviour observed in the 32860 cell line.

The genomic profile of a series of 177 head and neck squamous cell carcinomas diagnosed at locally advanced stages was defined and the alterations found were associated with the response to the TPF regimen. Tumours from patients with toxicity to treatment presented a greater number of genomic changes. Losses in 4p were more frequent in this group, suggesting that this alteration could determine toxicity to TPF therapy. In addition, the region where *ATG7* is located was analyzed and deletions were identified in 64.4% of the cases in the overall series, so this is a recurrent alteration in head and neck squamous cell carcinoma.

Moreover, overexpression of *ABCB1*, encoding MDR1, a drug efflux pump, and underexpression of *DNAJC15*, encoding MCJ, a negative regulator of mitochondrial respiration, were identified in CAL33-R and 32816-R cell lines. These alterations were shown to be essential for taxane resistance in these cell lines and taken together could constitute a potential response biomarker. Phenotype characterization of CAL33-R and

32816-R cell lines revealed decreased proliferation and increased migratory capacity probably due to dysregulation of key signalling pathways in these processes. In addition, the role of extracellular vesicles in taxane resistance was analyzed. Differences in the protein content of vesicles released by the CAL33 and CAL33-R cell lines were identified, highlighting the possible transfer of resistance to other tumour cells using this mechanism.

Finally, the response of taxane-resistant cell lines to other therapies was studied. These cell lines retained the response to 5-FU and showed increased sensitivity to DNA-damaging agents, including cisplatin and radiation. The reason for this cross-sensitivity is an increase in the levels of DNA damage together with alterations in DNA repair pathways. The response to olaparib, an inhibitor of DNA damage repair, was studied and it was observed that taxane-resistant cells also showed increased sensitivity to this drug, that should be considered as a therapeutic alternative.

The results obtained suggest that *ATG7* could condition taxane response in head and neck squamous cell carcinoma. Furthermore, *ABCB1* overexpression together with *DNAJC15* underexpression could be a biomarker of taxane response, determining the existence of resistance to treatment. The mechanism underlying this resistance could be based on an increase in mitochondrial ATP, production due to the loss of *DNAJC15* expression, used by the efflux pump MDR1 to expel the drug, reducing its intracellular concentration and effect. The combination of DNA-damaging agents with DNA repair inhibitors could constitute an effective therapeutic alternative in taxane-resistant head and neck squamous cell carcinoma.

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
aCGH	Arrays de hibridación genómica comparada
APS	Persulfato de amonio
ATG	<i>Autophagy related genes</i>
ATP	Adenosín trifosfato
BER	Reparación por escisión de bases
BIRC	<i>Baculoviral IAP Repeat Containing</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDKN2A	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA complementario
CECC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
CET	Cetuximab
CIAA	Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
CIS	Cisplatino
CNA	Alteración en el número de copias
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4</i>
CYP1A1	<i>Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAJC15	<i>DnaJ Heat Shock Protein Family (Hsp40) Member C15</i>
DOI	Profundidad de invasión
DSBR	Reparación de roturas de doble cadena
EDTA	Ácido etilenodiaminatetraacético
EE	Estabilización de la enfermedad
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EMT	Transición epitelio-mesénquima
ENE	Extensión extranodal
ERCC1	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 1</i>
ERCC2	<i>Excision Repair Cross-Complementation Group 2</i>
EV	Vesícula extracelular

FANC	<i>Fanconi Anemia Complementation Group</i>
FBS	Suero fetal bovino
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FdUMP	Monofosfato de fluorodesoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodesoxiuridina
FFPE	Fijado en formalina e impregnado en parafina
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
GFP	Proteína verde fluorescente
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
gRNA	RNA guía
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GSTM1	<i>Glutathione S-Transferase Mu 1</i>
HDR	Reparación directa por homología
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF1A	<i>Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha</i>
IAP	<i>Inhibition of apoptosis</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC50	Concentración inhibitoria media
IKBKG	<i>Inhibitor Of Nuclear Factor Kappa B Kinase Regulatory Subunit Gamma</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
IL	Interleucina
IMS	Espectrometría de movilidad iónica
ISEV	<i>International Society for Extracellular Vesicles</i>
JAK	<i>Janus kinase</i>
KO	<i>Knockout</i>
LAMP	<i>Lysosomal Associated Membrane Protein</i>
LC	Cromatografía líquida
LC3	<i>Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3</i>
LMP	Punto de fusión bajo
LMP1	<i>Latent membrane protein 1</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i> o RNA largo no codificante
LOH	Pérdida de heterocigosidad
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>

MCJ	<i>Methylation-controlled J-protein</i>
MDR	<i>Multidrug resistance</i> o resistencia a múltiples drogas
MIP	Sonda de inversión molecular
miRNA	microRNA
MISEV	<i>Minimal information for studies of extracellular vesicles</i>
MMR	Reparación de bases mal emparejadas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
mRNA	<i>Messenger RNA</i> o RNA mensajero
MS	Espectrometría de masas
MTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NER	Reparación por escisión de nucleótidos
NF-κB	<i>Nuclear Factor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
NHEJ	Unión de extremos no homólogos
NMP	Punto de fusión normal
NTA	Análisis de rastreo de nanopartículas
ORA	<i>Over-representation analysis</i>
PBS	Tampón fosfato salino
PE	Fosfatidiletalona
PI	Yoduro de propidio
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
PTEN	<i>Phosphatase And Tensin Homolog</i>
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
P-gp	P-glicoproteína
P/S	Penicilina/estreptomicina 1:1
QRTC	Quimiorradioterapia concomitante con cisplatino
QT	Quimioterapia
QTI	Quimioterapia de inducción
q-PCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
RB	<i>Retinoblastoma-Associated Protein</i>
RC	Respuesta completa
REDECAN	Red Española de Registros de Cáncer
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas del oxígeno
RP	Respuesta parcial
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RSF	<i>Remodeling And Spacing Factor</i>
RT	Radioterapia
RTIM	Radioterapia de intensidad modulada
RT-qPCR	PCR cuantitativa tras transcripción reversa
SEOM	Sociedad Española de Oncología Médica
SDS	Dodecilsulfato sódico
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
STAT	<i>Signal Transducer and activator of transcription</i>
TALEN	<i>Transcription activator-like effector nuclease</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	<i>Toll Like Receptor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOX	Toxicidad al tratamiento
TPF	Docetaxel (Taxotere), cisplatino (Platinol) y flurouracilo
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TTCC	Grupo Español de Tumores de Cabeza y Cuello
UDG	<i>Uracil DNA Glycosylase</i>
VEB	Virus de Epstein-Barr
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
VPH	Virus del papiloma humano
WebGestalt	<i>WEB-based Gene Set Analysis Toolkit</i>
5-FU	5-fluorouracilo

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	3
1. El carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	3
1.1. Epidemiología.....	4
1.2. Etiología.....	6
1.2.1. Tabaco.....	6
1.2.2. Alcohol.....	7
1.2.3. Nuez de areca.....	8
1.2.4. Infecciones víricas.....	8
1.2.5. Factores ambientales y ocupacionales.....	9
1.2.6. Susceptibilidad genética.....	10
1.2.7. Otros factores de riesgo.....	10
1.3. Carcinogénesis.....	11
1.3.1. Tumores asociados a VPH.....	13
1.3.2. Tumores asociados a carcinógenos.....	17
1.4. Alteraciones moleculares.....	18
1.4.1. La vía de señalización de EGFR.....	18
1.4.2. La vía de señalización de PI3K/AKT/Mtor.....	19
1.4.3. La vía de señalización de MAPK.....	19
1.4.4. Vía de señalización JAK/STAT.....	19
1.4.5. Vía de señalización HGF/MET.....	20
1.4.6. La vía de señalización p53/pRb.....	21
1.4.7. La vía de señalización de NF- κ B.....	21
1.4.8. Las vías de señalización Wnt/ β -catenina y Notch.....	22
1.4.9. Otras vías de señalización.....	23
1.5. Alteraciones citogenéticas.....	24
1.6. Diagnóstico y estadiaje.....	25
2. Tratamiento del carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	27
2.1. Terapias estandarizadas.....	28
2.1.1. Enfermedad temprana: estadios clínicos I y II.....	28
2.1.2. Enfermedad localmente avanzada: estadios clínicos III, IVa y IVb.....	29
2.1.2.1. Régimen terapéutico TPF.....	30
2.1.3. Enfermedad metastásica: estadio clínico IVc.....	32
2.1.4. Enfermedad recurrente.....	33
2.1.5. Toxicidad al tratamiento.....	34
2.2. Quimiorresistencia en carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	34
2.2.1. Mecanismos de quimiorresistencia.....	35
2.2.1.1. Reparación del daño en el DNA y el RNA.....	35
2.2.1.2. Expulsión de fármacos.....	36
2.2.1.3. Inhibición de la apoptosis.....	37
2.2.1.4. Activación de la señalización de EGFR, FAK y NF κ B.....	37
2.2.2. Resistencia a taxanos.....	38
2.2.3. El papel de las vesículas extracelulares en quimiorresistencia.....	41
3. El proceso de autofagia celular.....	43
3.1. Bases moleculares de la autofagia.....	44
3.2. El papel de la autofagia en cáncer.....	47
3.2.1. La autofagia en la supresión tumoral.....	48
3.2.2. La autofagia en la progresión tumoral.....	49
3.2.3. El papel dual de la autofagia en la metástasis.....	50

3.2.4. La alteración de la autofagia en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	50
3.3. El papel de la autofagia en quimiorresistencia.....	52
HIPÓTESIS.....	55
OBJETIVOS.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
1. Pacientes incluidos en el estudio.....	63
2. Cultivos celulares.....	64
2.1. Líneas celulares.....	64
2.2. Congelación, descongelación y mantenimiento.....	65
2.3. Contaje de células.....	66
3. Generación de líneas celulares resistentes a taxanos.....	67
4. Determinación del cariotipo de líneas celulares.....	68
5. Estudio de proliferación celular mediante ensayo de viabilidad celular MTT.....	70
6. Estudio de migración celular mediante el ensayo de cierre de herida.....	71
7. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares.....	72
7.1. Aislamiento de vesículas extracelulares por ultracentrifugación.....	72
7.2. Caracterización de vesículas extracelulares por análisis de rastreo de nanopartículas.....	74
7.3. Visualización de vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión.....	75
8. Edición génica con la tecnología CRISPR/Cas9.....	75
8.1. Diseño de gRNA.....	76
8.2. Clonación de gRNA en el vector PX458.....	78
8.3. Transformación de bacterias competentes.....	81
8.3.1. Extracción y purificación de DNA plasmídico.....	82
8.3.2. Extracción y purificación de DNA plasmídico mediante minipreps.....	82
8.4. Extracción y purificación de DNA plasmídico mediante maxipreps.....	82
8.5. Confirmación de la inserción de los gRNA en el vector PX458 mediante secuenciación Sanger.....	83
8.6. Transfección de la línea celular 32816 mediante electroporación.....	84
8.7. Single cell sorting mediante citometría de flujo.....	85
9. Análisis de la respuesta a fármacos.....	86
9.1. Fármacos.....	86
9.2. Ensayo de viabilidad celular MTT.....	87
9.3. Ensayo de apoptosis.....	88
9.4. Análisis de ciclo celular.....	90
10. Análisis de la respuesta a radiación.....	91
11. Ensayo COMET para la determinación del daño celular.....	91
12. Técnicas de manipulación de los ácidos nucleicos.....	92
12.1. Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado.....	93
12.2. Extracción de DNA a partir de líneas celulares.....	94
12.3. Extracción de RNA a partir de líneas celulares.....	95
12.4. Cuantificación de ácidos nucleicos.....	96
12.5. Síntesis de DNA complementario mediante transcripción reversa.....	96
12.6. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR.....	97
12.7. Electroforesis en gel de agarosa.....	98
12.8. Purificación de productos de PCR.....	98
12.9. Secuenciación automática por el método de Sanger.....	99
12.10. PCR cuantitativa comparativa.....	99

12.11.	Arrays de hibridación genómica comparada.....	103
12.12.	Estudio del transcriptoma mediante microarrays de expresión.....	105
13.	Técnicas de manipulación y análisis de proteínas.....	106
13.1.	Extracción de proteínas a partir de líneas celulares.....	106
13.2.	Cuantificación proteica por el método de Bradford.....	106
13.3.	<i>Western blot</i>	107
13.4.	Inmunofluorescencia.....	111
13.5.	Estudio del proteoma mediante cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas.....	112
14.	Análisis de enriquecimiento funcional.....	113
15.	Restauración de la expresión de DNAJC15 en la línea celular 32816-R.....	114
15.1.	Clonación del cDNA de DNAJC15 en el vector pLVX-puro.....	114
15.2.	Transfección de las células HEK 293T.....	119
15.3.	Infección de las células 32816-R.....	120
15.4.	Estudio de la respuesta a paclitaxel de las células 32816-R tras el restablecimiento de la expresión de DNAJC15.....	122
16.	Tratamiento estadístico de los datos.....	122
RESULTADOS.....		125
CAPÍTULO I. Generación de líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello resistentes a taxanos.....		125
1.	Comprobación de la adquisición de resistencia a paclitaxel en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	125
2.	Determinación del cariotipo de las líneas celulares.....	128
3.	Caracterización genética y molecular de la línea celular 32860.....	130
3.1.	Caracterización de las alteraciones en el número de copias de la línea celular 32860.....	130
3.2.	Análisis de los genes con expresión diferencial entre las líneas celulares 32816 y 32860 mediante microarrays de expresión.....	132
3.3.	Estudio del proceso de autofagia en las líneas celulares de CECC.....	134
CAPÍTULO II. Caracterización del papel de la pérdida de ATG7 en la resistencia a taxanos en líneas celulares de CECC.....		135
1.	Inactivación del gen ATG7 en la línea celular 32816 mediante la tecnología CRISPR-Cas9.....	135
2.	Estudio de la vía de señalización de la autofagia.....	137
3.	Estudio de la respuesta a paclitaxel.....	141
4.	Estudio de la respuesta a la inducción de resistencia a paclitaxel.....	142
CAPÍTULO III. Identificación de las alteraciones genómicas presentes en muestras tumorales de carcinomas escamosos de cabeza y cuello y su asociación con la respuesta y la toxicidad a la quimioterapia de inducción TPF.....		145
1.	Perfil de alteraciones genómicas en las muestras de CECC.....	145
2.	Asociación de las alteraciones genómicas en los brazos cromosómicos con la respuesta al régimen TPF.....	146
3.	Asociación de los cambios focales con la respuesta al régimen TPF.....	148
4.	Determinación del estado del gen ATG7 mediante PCR cuantitativa comparativa.....	151
CAPÍTULO IV. Caracterización molecular y fenotípica de las líneas celulares de carcinoma escamoso y cuello resistentes a taxanos.....		153

1. Caracterización de las alteraciones en el número de copias de la línea celular 32816-R.....	153
2. Caracterización de los cambios de expresión diferenciales en las líneas celulares resistentes a taxanos.....	154
2.1. Estudio del transcriptoma mediante microarrays de expresión.....	154
2.2. Análisis de los cambios de expresión diferenciales de las líneas celulares resistentes a taxanos.....	158
3. Reversión de la resistencia a taxanos mediante el tratamiento con verapamilo.....	160
4. Reversión de la resistencia a taxanos mediante la restauración de la expresión de MCJ.....	161
5. Identificación de alteraciones en el número de copias en los genes <i>ABCB1</i> y <i>DNAJC15</i> en muestras tumorales.....	163
6. Análisis de la capacidad proliferativa de las líneas celulares resistentes a taxanos.....	163
7. Análisis de la capacidad migratoria de las líneas celulares resistentes a taxanos.....	164
8. Papel de las vesículas extracelulares en la resistencia a taxanos.....	166
8.1. Caracterización de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión.....	167
8.2. Caracterización de las vesículas extracelulares mediante análisis de rastreo de nanopartículas.....	167
8.3. Determinación del contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante <i>western blot</i>	168
8.4. Determinación del contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.....	169
 CAPÍTULO V. Análisis de la respuesta a distintas terapias de las líneas celulares resistentes a taxanos.....	173
1. Estudio de la respuesta a 5-fluorouracilo.....	173
2. Estudio de la respuesta a cisplatino.....	174
3. Estudio de la respuesta a radiación.....	176
4. Análisis del daño en el DNA.....	176
5. Análisis de los cambios de expresión de genes asociados a la reparación del DNA.....	178
6. Estudio de la respuesta a olaparib.....	179
 DISCUSIÓN.....	187
1. Inducción de resistencia a taxanos en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	183
2. El papel de la pérdida <i>ATG7</i> en la línea celular 32816.....	183
3. Alteraciones genómicas en muestras tumorales de CECC.....	187
4. Estudio molecular y fenotípico de la resistencia a taxanos.....	191
5. Estudio del papel de las vesículas extracelulares en la resistencia a taxanos.....	195
6. Alternativas terapéuticas en CECC resistente a taxanos.....	196
 CONCLUSIONES.....	201
 CONCLUSIONS.....	203
 BIBLIOGRAFÍA.....	207



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. El carcinoma escamoso de cabeza y cuello

El cáncer de cabeza y cuello engloba un conjunto de neoplasias localizadas en el tracto aerodigestivo superior que, en su mayor parte (más del 90% de los casos), se originan en el epitelio escamoso y se conocen, de manera conjunta, como carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC). De este modo, el término CECC se basa en la clasificación histopatológica e incluye tumores localizados, principalmente, en la cavidad oral, la faringe (hipofaringe, orofaringe y nasofaringe) y la laringe (**Figura 1**)¹⁻³.

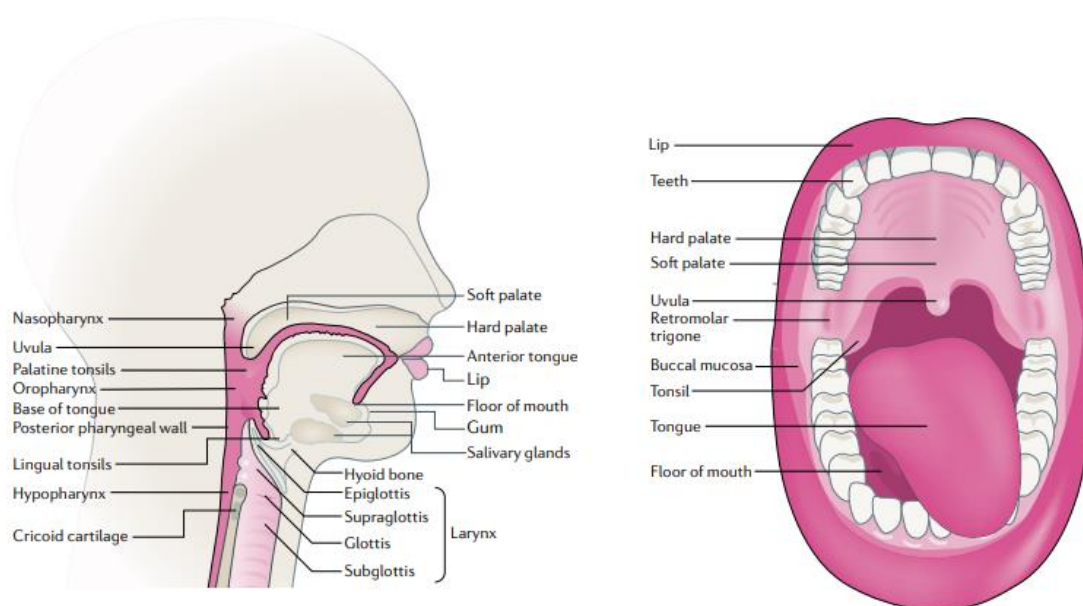


Figura 1. Localizaciones anatómicas en las que se desarrolla el CECC. Obtenido de Johnson *et al.*, 2020¹.

A pesar de su origen común en el epitelio de la mucosa, el CECC agrupa un conjunto de tumores con un elevado grado de heterogeneidad, a nivel genético, clínico-patológico y molecular, lo que dificulta su consideración como una única entidad^{4,5}. Esto puede ser debido a que el CECC puede afectar a distintas estructuras anatómicas, con distinto drenaje linfático y sanguíneo. Además, existen distintos factores etiológicos asociados al desarrollo del CECC que repercuten en el perfil molecular del tumor y, en consecuencia, en la respuesta terapéutica y en el pronóstico. Por otra parte, existen casos de CECC sin ningún factor de riesgo conocido asociado, que carecen de una caracterización molecular precisa⁵.

1.1. Epidemiología

Actualmente, según las estimaciones de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el CECC es el séptimo cáncer más común a nivel mundial, con un número estimado de 890000 nuevos casos por año, lo que constituye aproximadamente un 4,5% de todos los diagnósticos de cáncer a nivel mundial, siendo más frecuente el cáncer de labio y cavidad oral, con 380000 casos anuales, seguido de la laringe, con 185000 casos, cuando se consideran de manera independiente la nasofaringe (133000 casos), la orofaringe (98000 casos) y la hipofaringe (84000 casos) y, en último lugar, las glándulas salivares, con 54000 casos anuales a nivel global⁶.

La tasa de incidencia del CECC varía considerablemente en función de la región geográfica y de las características demográficas, tal y como se puede observar en la **Figura 2**^{1,6}.

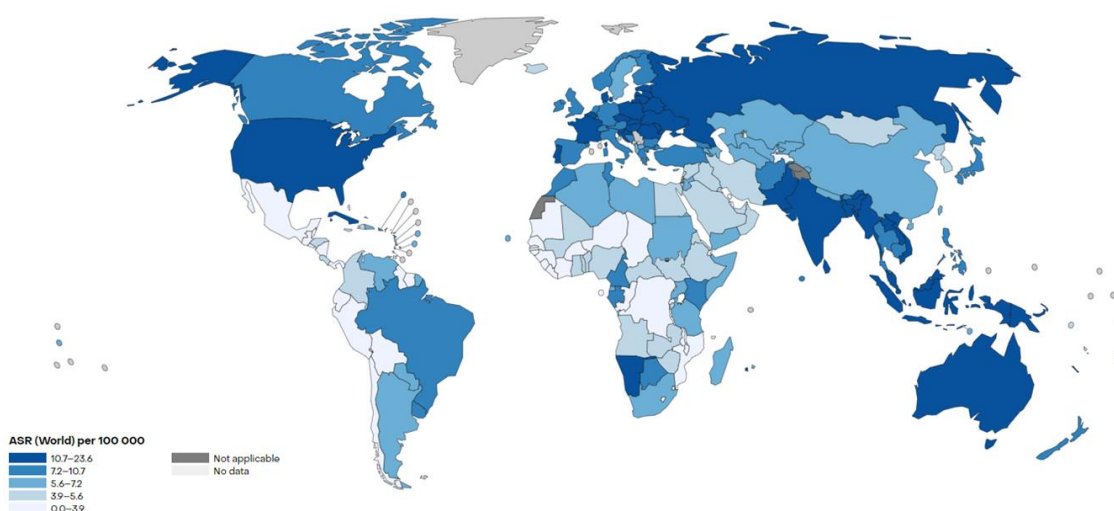


Figura 2. Tasas de incidencia estimadas ajustadas por edad del CECC, para hombres y mujeres, a nivel global. Los datos proceden de la estimación del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN) para 2022. El mapa se generó con una herramienta online de GLOBOCAN, seleccionando, de manera conjunta, las siguientes localizaciones tumorales: labio y cavidad oral, laringe, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y glándulas salivares⁷.

El CECC es más frecuente en hombres que en mujeres, en una proporción 2:1 a nivel global y la edad al diagnóstico mayoritaria está por encima de los 50 años. Sin embargo, la incidencia del CECC está aumentando en muchos países, especialmente entre la población joven, con una predicción de un aumento del 30% en la incidencia anual para el año 2030. Esta tendencia puede deberse al cambio en factores relacionados con el estilo de vida, como a un incremento en el consumo de alcohol y una creciente prevalencia del cáncer orofaríngeo asociado al virus del papiloma humano

(VPH). De hecho, se ha estimado que el VPH sustituirá al tabaco como principal factor de riesgo asociado al CECC^{1,6}.

En España, los últimos datos publicados por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) y por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), indican que, en el año 2023, se han diagnosticado 12500 casos de CECC, siendo también el séptimo tipo de cáncer más frecuente en nuestro entorno (**Figura 3**)^{8,9}. De manera análoga a lo descrito a nivel mundial, se aprecia un incremento progresivo de los tumores relacionados con el VPH⁹.

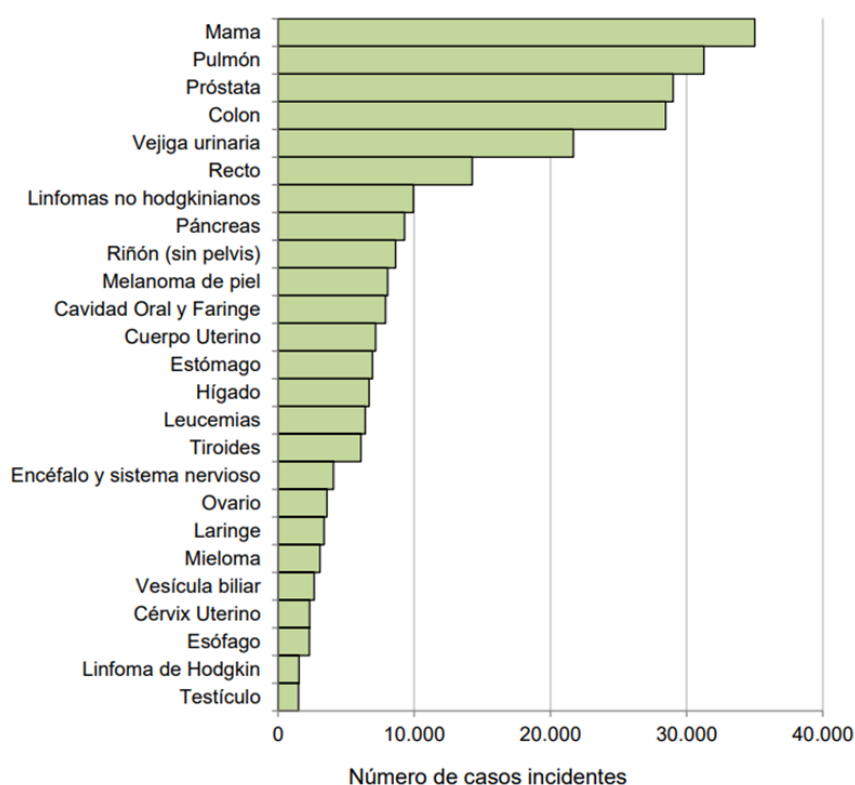


Figura 3. Número estimado de casos incidentes de cáncer en España por tipo tumoral para el año 2023, teniendo en cuenta ambos sexos de manera conjunta. Los casos de CECC se recogen en dos categorías separadas, cavidad oral y faringe y laringe. Datos publicados por REDECAN en 2023⁸.

En cuanto a mortalidad, la IARC estima que el CECC causa 450000 muertes anuales a nivel global, siendo responsable de un 4,6% de las muertes asociadas a cáncer. Del mismo modo que la incidencia, la mortalidad asociada a CECC varía de manera considerable en función del área geográfica y de las características de la población, que se asocian a grandes diferencias en la etiología (**Figura 4**). Asimismo, las diferencias en el estilo de vida y en el acceso a la asistencia sanitaria pueden explicar la mayor incidencia y la menor supervivencia del CECC observada en las comunidades de nivel socioeconómico más bajo en los países desarrollados⁶.

En España, según los últimos datos publicados por la SEOM, en el año 2022 ha habido 3624 fallecimientos asociados a CECC, 2454 causados por tumores malignos en el labio, la cavidad oral y la faringe y 1170 causados por tumores malignos en la laringe¹⁰.

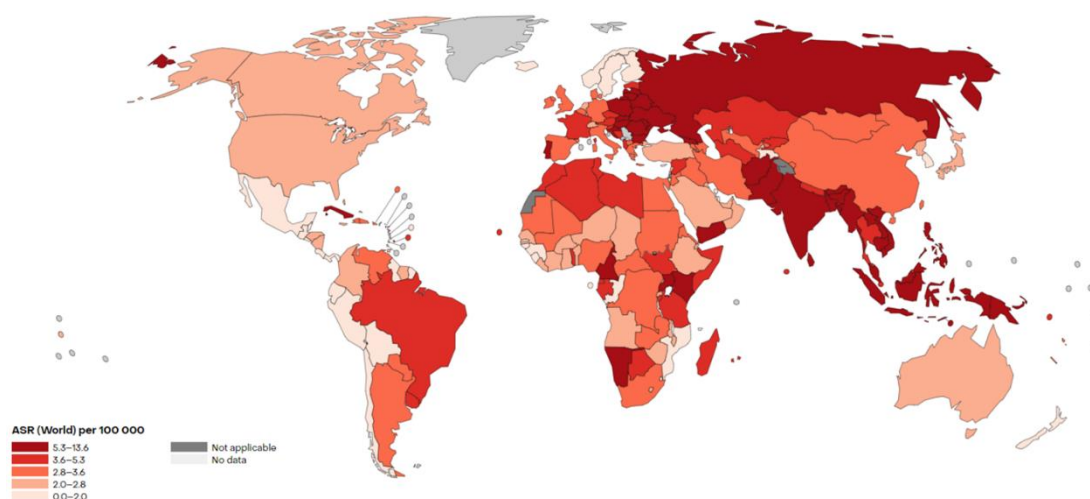


Figura 4. Tasas de mortalidad estimadas ajustadas por edad del CECC, para hombres y mujeres, a nivel global. Los datos proceden de la estimación GLOBOCAN para 2022. El mapa se generó con una herramienta online de GLOBOCAN, seleccionando, de manera conjunta, las siguientes localizaciones tumorales: labio y cavidad oral, laringe, nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y glándulas salivares.

1.2. Etiología

Los principales factores de riesgo asociados al CECC son el tabaco, el alcohol, la nuez de areca y determinadas infecciones víricas, como el VPH (en el caso del cáncer orofaríngeo) y el virus de Epstein-Barr (VEB) (en el caso del cáncer nasofaríngeo)⁶. Además, diversos estudios epidemiológicos han descrito otros agentes ambientales y genéticos importantes en la etiología de este tumor^{11,12}. La interacción de diversos factores etiológicos aumenta considerablemente el riesgo de padecer CECC, siendo preciso señalar el efecto sinérgico del tabaco y el alcohol. De hecho, entre el 70 y el 80% de los casos de CECC se asocian a la combinación del consumo de tabaco y alcohol¹³.

1.2.1. Tabaco

El tabaco y el humo derivado del consumo de tabaco contienen una compleja mezcla de más de 9500 compuestos químicos, muchos de los cuales han sido reconocidos como peligrosos para la salud humana por las agencias reguladoras. Entre estos

compuestos se han identificado 83 agentes carcinogénicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, nitrosaminas, aminas aromáticas y aldehídos que se liberan durante la combustión a alta temperatura y que causan daño en el DNA de las células, favoreciendo el desarrollo del cáncer^{6,14}.

Actualmente, el tabaco continúa siendo el principal factor de riesgo en el CECC, con un efecto dosis-dependiente relacionado con la frecuencia y duración del consumo¹⁵⁻¹⁷. Se ha estimado que los fumadores habituales de cigarrillos de tabaco tienen un riesgo de padecer CECC entre 5 y 25 veces mayor que los no fumadores¹⁸. Los fumadores de pipa y puros, así como los consumidores habituales de tabaco de mascar, tienen un riesgo menor, pero también importante, de desarrollar CECC, estando el tabaco de mascar especialmente relacionado con el cáncer de cavidad oral⁶. Por otra parte, en los últimos años, se ha disparado el consumo de cigarrillos electrónicos que también confieren cierta predisposición al cáncer, aunque, los estudios más recientes, lo asocian con un menor riesgo a desarrollar CECC que el consumo de tabaco¹⁹. Sin embargo, es necesaria la realización de más estudios a largo plazo para poder obtener conclusiones consistentes^{1,19}.

La exposición a tabaco se asocia en mayor medida con el cáncer de laringe, seguido de los tumores de oro e hipofaringe, posiblemente debido al elevado grado de exposición de estos órganos al humo inhalado a través del consumo de tabaco^{20,21}. En los países desarrollados, de manera general existe una tendencia a la disminución del consumo de tabaco. Sin embargo, en ciertos grupos poblacionales, como en las mujeres, este consumo está aumentando. Los cambios en el estilo de vida asociados a factores demográficos están alterando progresivamente los datos epidemiológicos⁶.

1.2.2. Alcohol

Se ha estimado que el consumo de alcohol, entre no fumadores, es responsable de un 4% de los casos de CECC. El riesgo de desarrollar CECC aumenta de manera dosis-dependiente en función de la frecuencia y de la cantidad de alcohol consumido²².

Las propiedades del alcohol como disolvente aumentan la susceptibilidad del tejido mucoso a agentes carcinogénicos, como el humo del tabaco u otros carcinógenos ambientales. Probablemente, por este motivo, la interacción del consumo de alcohol y tabaco es la causa más frecuente del CECC, con un efecto sinérgico muy importante²³. Además, el acetaldehído, producido a partir del etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa durante la metabolización del mismo, también ha demostrado ser mutagénico⁶.

1.2.3. Nuez de areca

La nuez de areca, también conocida como la nuez de betel, es el fruto de la palmera de areca (*Areca catechu*), muy frecuente en el sur y el sureste asiático y en la Polinesia, donde las tasas de incidencia del CECC son de las más elevadas del mundo. En estas regiones, es responsable de más del 50% de los casos de CECC localizados en la cavidad oral o en la orofaringe^{6,24}.

La prevalencia del consumo de nuez de areca varía entre un 30 y un 80% en función de la región geográfica dentro de las zonas donde se encuentra la palmera de areca⁶. Constituye el quinto agente psicoactivo más frecuentemente consumido, después del alcohol, la nicotina, la cafeína y el cannabis. La nuez de areca se mastica junto con otras hierbas como parte de algunos rituales y también con fines recreativos, debido a sus efectos psicoactivos, entre los que se encuentran la euforia y la supresión del apetito y que se deben a que actúa como antagonista de los receptores GABA²⁵. A menudo, se prepara con tabaco, lo que probablemente incrementa de manera sinérgica su asociación con el desarrollo de CECC^{1,6,24}.

1.2.4. Infecciones víricas

En los últimos años, las infecciones víricas se han consolidado como uno de los principales factores etiológicos del CECC, principalmente por VPH y VEB^{6,26}.

El VPH se transmite principalmente a través del sexo oral, especialmente en poblaciones no vacunadas frente al VPH¹. Por este motivo, tener un elevado número de parejas sexuales y practicar sexo oral sin protección son factores de riesgo para el CECC asociado a VPH. Asimismo, se ha descrito una correlación entre padecer algún tipo de inmunodeficiencia y desarrollar CECC asociado a infecciones víricas. La infección por VPH se asocia principalmente con cáncer de orofaringe, cuya incidencia está en aumento, especialmente entre la población joven, debido probablemente al cambio en las prácticas sexuales^{27,28}.

En algunos países, como en Estados Unidos, el CECC ya ha superado al cáncer cervical como el principal cáncer asociado a infección por VPH. Se han identificado más de 20 serotipos de alto riesgo de VPH, que se diferencian por las proteínas de la cápside del virus. El serotipo 16 (VPH16) es responsable del 85-90% de los casos de cáncer de orofaringe asociado a VPH. Esto difiere de lo observado en el cáncer cervical, en el que tanto el VPH16 como el VPH18 son responsables del 50% de los casos^{6,27,29,30}.

El cáncer orofaríngeo asociado a VPH constituye una entidad diferente desde el punto de vista clinicopatológico y molecular, con mucho mejor pronóstico que el CECC

negativo para VPH. De hecho, la supervivencia media es mucho mayor en este subgrupo de pacientes, siendo 130 meses, en comparación con los 20 meses del subgrupo de CECC negativo para VPH^{31,32}. Los mecanismos moleculares subyacentes en el CECC asociado a VPH difieren del relacionado con otros factores etiológicos. Se ha descrito que presentan una mayor infiltración de células B en el microambiente tumoral, menos mutaciones genéticas y mantienen intacta la respuesta apoptótica. Estas características pueden ser responsables de la mejor respuesta terapéutica de estos pacientes y, por todo ello, cada vez resulta más evidente que el carcinoma escamoso de orofaringe asociado a VPH debe ser considerado como una entidad diferente, con las consecuentes implicaciones terapéuticas^{33,34}.

El carcinoma nasofaríngeo es poco frecuente en la mayoría de las poblaciones. Sin embargo, en ciertas regiones, como en algunos países asiáticos, presenta altas tasas de incidencia. La infección por VEB es el principal factor etiológico asociado al cáncer de nasofaringe³⁵. El VEB, que pertenece a la familia de los herpesvirus, es una infección frecuente en la infancia, donde habitualmente no causa síntomas graves. La IARC considera al VEB como causa establecida de distintas neoplasias malignas, como el carcinoma nasofaríngeo, distintos tipos de linfomas y algunos subgrupos de cáncer gástrico. La edad de infección, la variante de VEB, el sistema inmune del portador y la presencia de otros factores de predisposición pueden influir en el riesgo de carcinoma nasofaríngeo asociado a VEB³⁶.

El establecimiento de una infección estable de VEB en el epitelio supone un estadio temprano en el desarrollo del carcinoma nasofaríngeo. Tanto los genes latentes como líticos parecen estar involucrados en la transformación maligna de este epitelio, mediante diferentes vías. Los genes líticos pueden inducir la inestabilidad genómica y estimular la liberación de citocinas inmunosupresoras. Por otro lado, la expresión de genes latentes contribuye a la tumorigénesis y a la indiferenciación celular. Además, se ha descrito que la infección por VEB promueve un fenotipo hipermetilador que lleva a la inactivación de genes supresores de tumores. Uno de los genes víricos del VEB más descritos es *LMP1* que induce la transformación tumoral principalmente mediante la activación de NF- κ B³⁷.

1.2.5. Factores ambientales y ocupacionales

A pesar de que los factores ambientales y ocupacionales parecen ocupar un papel menor dentro de la etiología del CECC, se ha descrito la asociación de la exposición continuada a ciertos agentes ambientales, muchos de ellos, relacionados con sectores profesionales concretos, con el riesgo a desarrollar cáncer de cabeza y cuello. Entre

estos agentes se encuentran carcinógenos como los asbestos, ciertos humos, pesticidas y fertilizantes. Se ha observado una mayor incidencia de CECC en los trabajadores de la metalurgia, la construcción y el sector agrícola, entre otros. La interacción de este con otros factores etiológicos podría tener un efecto importante en el riesgo a desarrollar CECC^{38,39}.

1.2.6. Susceptibilidad genética

Existen diversos factores genéticos que contribuyen al riesgo de CECC, lo que concuerda con la aparición de agregaciones familiares^{40,41}. Diversos estudios han permitido relacionar ciertos polimorfismos en genes que participan en el metabolismo de carcinógenos y en la inmunidad con una mayor predisposición al CECC. Algunos de estos genes son *ERCC1*, *ERCC2*, *CTLA4*, *IL2*, *IL6*, *IL10*, *NFE2L2*, *TP53*, *MDM2*, *BCL2*, *CYP1A1* y *GSTM1*, que están relacionados con distintos procesos celulares como la reparación del daño en el DNA, la apoptosis, la oxidación y la inflamación. De este modo, está establecido que una menor capacidad para metabolizar agentes carcinogénicos, un sistema inmune debilitado o una peor respuesta ante el daño celular puede contribuir al desarrollo de este tipo de cáncer⁴²⁻⁴⁶.

Por otra parte, se ha descrito que los individuos con anemia de Fanconi, que es una enfermedad hereditaria poco frecuente, causada por mutaciones en hasta 22 genes diferentes de la familia *FANC*, que se caracteriza por una menor capacidad de reparar el daño del DNA tienen un mayor riesgo a padecer CECC, especialmente de cavidad oral y aparición temprana. Los mecanismos moleculares responsables de esta asociación no están bien descritos, pero es probable que las vías de señalización mediadas por los genes que pueden estar alterados en la anemia de Fanconi tengan un papel relevante^{1,47}. Las personas con este diagnóstico también tienen una mayor probabilidad de desarrollar otros tipos de cáncer, como el síndrome mielodisplásico o la leucemia mielocítica⁶.

Asimismo, hay que tener en cuenta que ciertos hábitos asociados con el CECC, como el consumo alcohólico o tabáquico, también se pueden ver influenciados por factores genéticos⁴⁰.

1.2.7. Otros factores de riesgo

Además de los mencionados anteriormente, se han descrito otros factores de riesgo asociados al CECC. Los factores dietéticos tienen un papel dual en la probabilidad de desarrollar cáncer. Existen alimentos, como las frutas y los vegetales, cuya ingesta tiene un efecto protector que parece estar causado por las propiedades anticarcinogénicas y

antioxidantes de muchos de los compuestos que contienen, como carotenoides, ácido fólico, ácido fenólico, esteroides, flavonoides o vitaminas⁴⁸. Por otra parte, diversos estudios de caso-control confirman que el consumo frecuente de carnes procesadas con altos niveles de nitritos puede aumentar el riesgo de padecer CECC⁴⁹.

Además, se han relacionado con el CECC otros factores como una escasa higiene bucal y la inflamación e infección crónica de la cavidad oral (como la periodontitis crónica)^{6,50}. Estudios recientes ponen de manifiesto de la importancia del microbioma oral en el desarrollo del CECC, una cuestión con gran potencial clínico, pero que todavía no se ha investigado en profundidad⁵¹.

Por último, es preciso señalar que el nivel socioeconómico y educacional tiene un efecto importante sobre el riesgo a padecer cáncer^{52,53}.

1.3. Carcinogénesis

El CECC surge debido a la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas en genes que codifican proteínas implicadas en distintas vías de señalización, dando lugar a fenotipos diferentes asociados al cáncer. En este proceso tienen especial relevancia las lesiones precancerosas derivadas de células que acumulan alteraciones genéticas y que pueden progresar y dar lugar al desarrollo del cáncer. En el caso del CECC, principalmente en la cavidad oral, existen lesiones precancerosas visibles que tienen lugar en el revestimiento de la mucosa y que pueden ser blancas (leucoplasia) o rojas (eritroplasia), cuyo estudio es necesario para establecer el proceso carcinogénico en el cáncer de cabeza y cuello. Además, existen otras lesiones premalignas en la mucosa que no son clínicamente visibles y que también pueden dar lugar al cáncer^{4,54,55}.

Desde que se han establecido los primeros modelos de progresión tumoral en CECC ha tenido mucha importancia el proceso de cancerización de campo, que explica el desarrollo de múltiples tumores primarios y de recurrencias locales. La cancerización de campo hace referencia a los cambios preneoplásicos y a las alteraciones genéticas del área adyacente al tumor, que puede haber sido expuesta a agentes carcinogénicos, aunque no permanezcan clínicamente ocultos^{56,57}.

Estudios recientes han determinado que los cambios genéticos en los brazos cromosómicos 3p, 17p y 9p, así como las mutaciones en los genes *CDKN2A* y *TP53*, son los mejores predictores de malignización, siendo eventos tempranos en el proceso carcinogénico que dan lugar a células hiperplásicas y displásicas en el epitelio de la mucosa^{1,58}. La hiperplasia hace referencia al aumento de la proliferación celular y la

displasia a la presencia de células anormales, no cancerosas. Por otro lado, las alteraciones en los brazos cromosómicos 11q, 13q, 14q, 6p, 8p, 10q y 4p son frecuentes en el paso de células displásicas a carcinoma in situ, pudiendo derivar en carcinoma invasivo y apareciendo en la fase tardía de la carcinogénesis. En la **Figura 5** se recoge, de manera esquemática, el proceso carcinogénico del CECC con los principales eventos genéticos descritos hasta el momento. Sin embargo, no ha sido posible definir con precisión la secuencia temporal de los eventos genéticos, debido en gran parte a que la gran mayor parte de diagnósticos de CECC ocurren en estadios localmente avanzados^{1,4}.

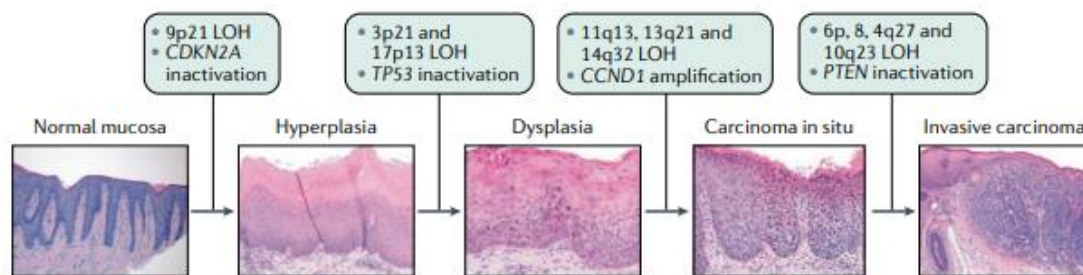


Figura 5. Modelo de desarrollo tumoral en CECC. En el esquema se muestra la secuencialidad de las principales alteraciones genéticas. Obtenido de Johnson *et al.*, 2020¹.

A lo largo de los últimos años, con el uso más extensivo de técnicas masivas, se han podido identificar diversos genes y vías de señalización celular implicadas en el CECC. De manera análoga, ha sido posible subclasificar esta entidad tan heterogénea. Sin embargo, sigue siendo necesario profundizar en esta cuestión y caracterizar a nivel molecular de manera más completa el CECC. Posiblemente, se puedan diferenciar nuevos subtipos de CECC en función del perfil molecular y de los mecanismos responsables del desarrollo y de la progresión tumoral, ya que continúa habiendo un elevado grado de heterogeneidad a nivel clinicopatológico. La primera clasificación de dos entidades moleculares diferentes se basó en la presencia o ausencia de VPH, pero actualmente se pueden distinguir distintos tipos de tumores dentro de los CECC no asociados a VPH⁵⁴.

En la **Figura 6** se resume el modelo carcinogénico de los tres principales subgrupos genéticos de CECC, establecidos en función de los factores etiológicos asociados. Los tumores de cabeza y cuello que contienen VPH transcripcionalmente activo constituyen el primer subtipo de CECC y se caracterizan por originarse principalmente en la orofaringe y por tener un mejor pronóstico⁴. En estos tumores, los oncogenes víricos E6 y E7 son los responsables de la carcinogénesis, ya que codifican proteínas capaces de

secuestrar y degradar proteínas celulares supresoras de tumores con un papel muy importante en el ciclo celular, como p53 y pRb^{30,59}.

Por otra parte, dentro de los CECC no asociados a VPH, se distinguen dos subgrupos principales en función de las alteraciones en el número de copias (CNA), pudiendo distinguir los tumores VPH-negativo con un gran número de CNA (CNA-high), de los tumores VPH-negativo sin CNA (CNA-silent). Los tumores VPH-negativo CNA-high se asocian principalmente con el consumo de tabaco, mientras que los tumores VPH-negativo CNA-silent parecen estar relacionados con la edad, aunque este punto no está claro. Las alteraciones genéticas y moleculares conocidas que median la progresión tumoral son diferentes para cada uno de estos subgrupos. Los tumores VPH-negativo CNA-high han sido más estudiados y, dentro de estos, se han identificado a su vez varios subtipos en función del perfil de expresión génica. Sin embargo, es necesaria la realización de más estudios que permitan completar esta caracterización^{4,60,61}.

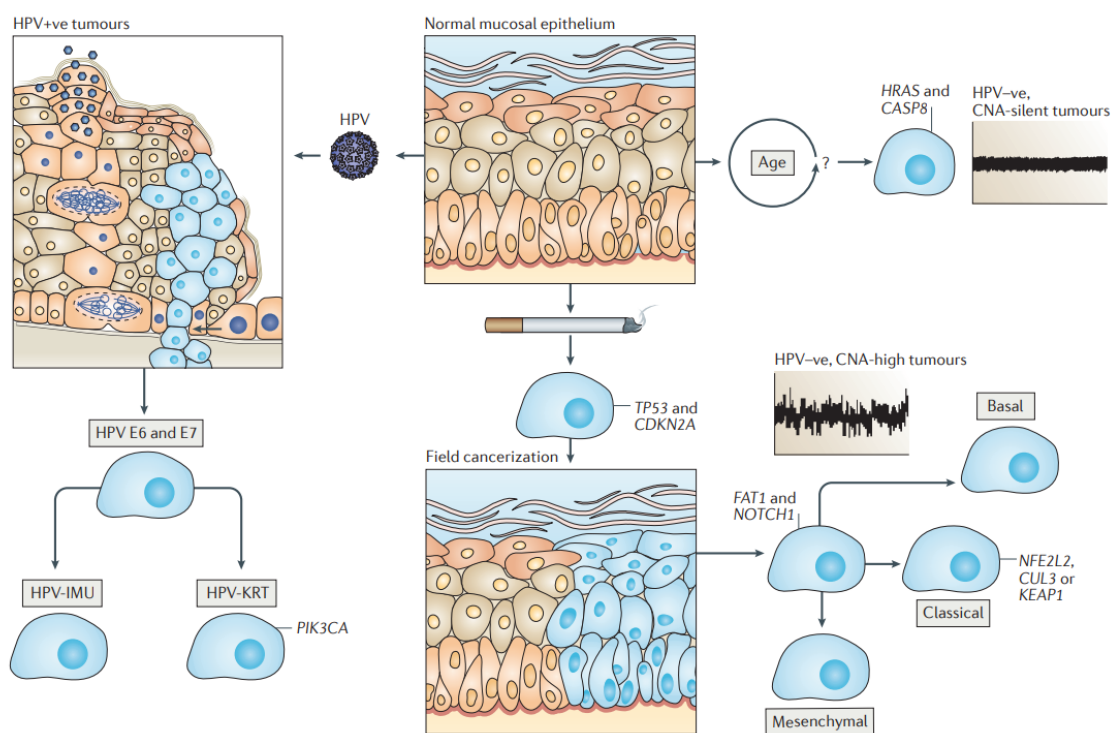


Figura 6. Modelos de carcinogénesis descritos en CECC. Para cada uno de los subgrupos establecido se muestra el factor etiológico asociado, el origen del proceso de desarrollo tumoral y las principales alteraciones genéticas conocidas. Obtenido de Leemans *et al.*, 2018⁴.

1.3.1. Tumores asociados a VPH

El VPH es un virus sin envoltura cuyo genoma está constituido por DNA circular de doble cadena de 8000 pares de bases (bp). Todos los tipos de VPH que se han identificado (más de 200) pueden infectar el epitelio mucoso o el cutáneo y completar

en él su ciclo de vida productivo. De todos ellos, la Organización Mundial de la Salud ha establecido 14 serotipos de alto riesgo que pueden infectar el epitelio mucoso, dada la evidencia científica de su implicación en el desarrollo del cáncer, entre los que se encuentra el VPH-16, responsable de al menos el 85% de los carcinomas orofaríngeos positivos para VPH^{4,30,59}.

Así, la infección con VPH es un evento temprano en el proceso carcinogénico del CECC VPH-positivo y, en la mayor parte de los casos, surge en el epitelio de las criptas de las amígdalas palatinas y linguales, tal y como se describe en la **Figura 7**¹.

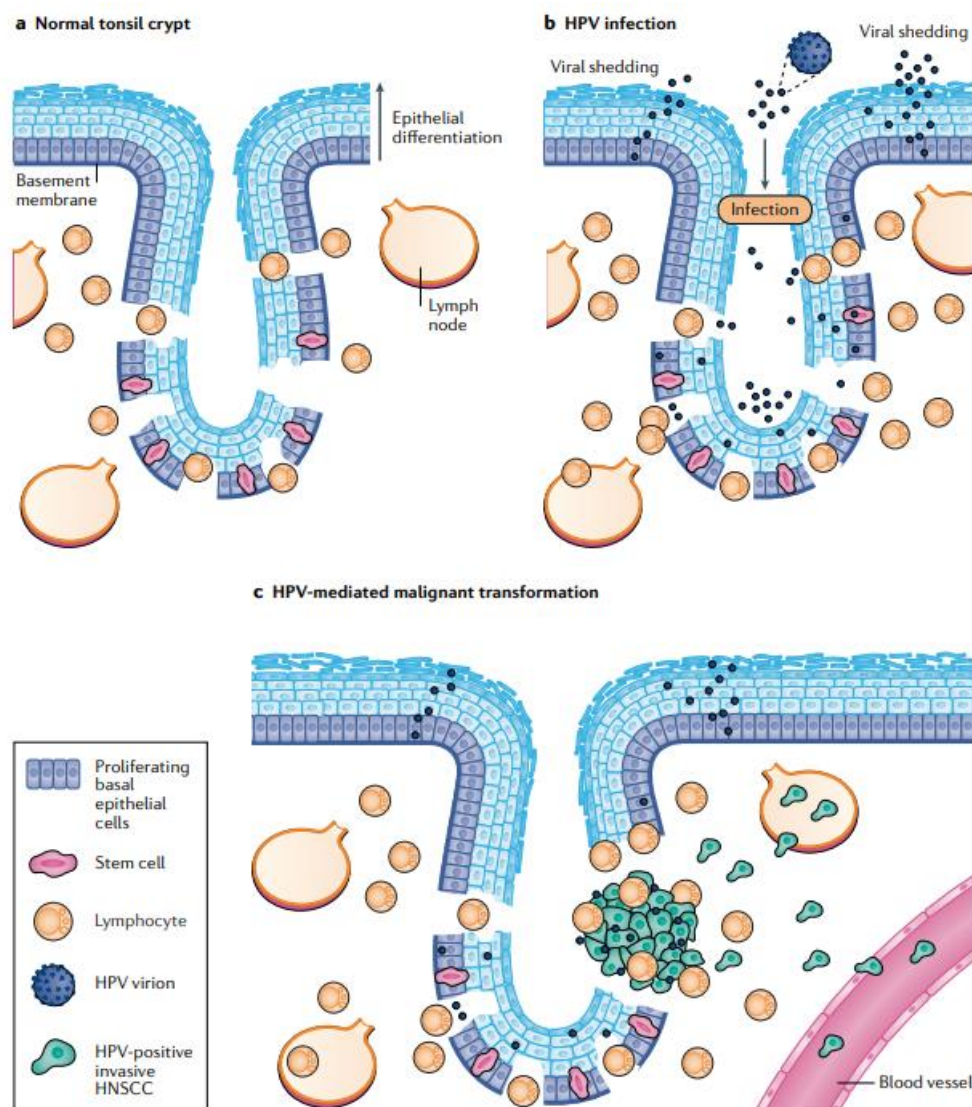


Figura 7. Modelo de desarrollo tumoral en carcinoma escamoso de orofaringe VPH-positivo. En la imagen se muestra una cripta de la amígdala en estado normal y el proceso de infección del virus y de la subsecuente transformación maligna mediada por VPH. Obtenido de Johnson *et al.*, 2020¹.

En el epitelio de la amígdala, los queratinocitos basales constituyen la capa celular adyacente a la membrana basal. Se trata de un epitelio estratificado, en el que la

diferenciación progresiva de estas células provoca su desprendimiento de la membrana basal y su migración hacia la parte superior, deteniéndose entonces su proliferación. El tejido de las amígdalas palatinas y linguales tiene numerosas invaginaciones, conocidas comúnmente como criptas, que se caracterizan por un enriquecimiento de células madre en su base. La estructura de las criptas está cubierta por un epitelio escamoso reticulado y se pueden observar huecos o fisuras en su membrana basal. Estas fisuras permiten la entrada de los linfocitos en las criptas y su interacción con antígenos externos extraños, como los virus^{1,30,34}.

Cuando tiene lugar la infección por VPH, las características del epitelio escamoso de esta cripta permiten el acceso de los virus a las células madre, a los queratinocitos basales que están proliferando y a la membrana basal. Las células del sistema inmune también pueden entrar en contacto con las partículas víricas. Si tiene lugar una infección productiva, los genes y las proteínas virales se expresan en células epiteliales en distintos estados de diferenciación, permitiendo la producción y liberación de nuevas partículas virales¹.

Se ha descrito que, probablemente, el CECC VPH-positivo se origine en las células madre o las células epiteliales basales. La carcinogénesis ocurre en el contexto de una infección persistente en el microambiente de las células de la cripta, donde las células del sistema inmune tienen un papel importante. Para que esto ocurra los virus cesan su ciclo de vida productivo. La integración estable del genoma viral en el genoma de la célula hospedadora junto con la actuación de las oncoproteínas codificadas por el genoma viral promueven la transformación celular, que tiene lugar cuando se acumulan diversas alteraciones genéticas^{1,30,62}.

El genoma del VPH consta de siete genes tempranos (E1-E7) y dos genes tardíos (L1 y L2). Los genes L1 y L2 codifican proteínas de la cápside del propio virus, mientras que los genes E1-E5 codifican proteínas necesarias para la replicación y transcripción del genoma del virus. Por otra parte, los genes E6 y E7 son necesarios para la transformación oncogénica de la célula huésped³⁰.

Concretamente, la proteína E6 forma un complejo con la ubiquitina ligasa E6-AP y la proteína supresora de tumores p53, promoviendo la ubiquitinación y degradación en el proteasoma de p53, una proteína fundamental en el control del ciclo celular, dando lugar a inestabilidad genómica y favoreciendo el desarrollo tumoral^{63,64}. El gen que codifica la proteína p53, denominado *TP53*, está mutado en la mayor parte de los CECC no asociados a VPH. Sin embargo, este gen rara vez está alterado en los tumores positivos para VPH, ya que esta proteína se degrada como consecuencia de su

interacción con la proteína vírica E6⁶⁵. Posiblemente, la expresión de la proteína vírica E6 tenga otras implicaciones en el proceso carcinogénico, pero estas están menos caracterizadas¹.

En cuanto a la proteína E7, su efecto principal es la acción inhibitoria ejercida sobre pRb, una proteína implicada en el control del ciclo celular mediante la inactivación de factores de transcripción de la familia E2F, que cuando están activados promueven la expresión de genes que participan en la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. La interacción de E7 y pRb causa la degradación proteolítica de pRb y la disociación del complejo formado por pRb y proteínas E2F, con la consecuente liberación y activación de estos factores de transcripción, la alteración del ciclo celular y la inducción de la proliferación celular. La proteína E7 interacciona con culina 2, una proteína que forma parte del complejo ubiquitín-ligasa, promoviendo la ubiquitinación y degradación en el proteasoma tanto de pRb como de otras proteínas de la familia del retinoblastoma. El cese de actividad de la proteína pRb debido a la acción de E7 conlleva a la sobreexpresión de p16^{INK4a}, otra proteína supresora de tumores que participa en el control del ciclo celular. La proteína p16^{INK4a} inhibe las quinasas 4 y 6 dependientes de ciclina D1, cuya función es regular la actividad de pRb mediante la fosforilación y activación de la misma^{1,30,66}. Por este motivo, la detección de p16^{INK4a} es uno de los marcadores moleculares más frecuentemente usados para clasificar los carcinomas orofaríngeos como VPH-positivos, que rara vez tienen mutaciones en el gen que codifica esta proteína, *CDKN2A*, a diferencia de los tumores VPH-negativos. Además, se conoce que la proteína E7 interacciona con otras proteínas que participan en la regulación del ciclo celular⁶⁵.

Por otro lado, la proteína E5 podría tener también un papel relevante en el proceso carcinogénico, principalmente contribuyendo a la progresión del ciclo celular¹. Además, se ha correlacionado la expresión de esta proteína con un incremento en los niveles de expresión del receptor de superficie celular EGFR, sin embargo, no son muy concluyentes, por lo que se necesita investigar en mayor profundidad la función de E5 en el desarrollo tumoral⁶⁷. Además, hay estudios que sugieren que las proteínas E2, E4 y E5 podrían participar en una vía de carcinogénesis alternativa en los tumores VPH-positivo⁶⁸.

De este modo, los CECC asociados a VPH presentan un perfil molecular diferencial respecto a los VPH-negativos, con un menor número de mutaciones y alteraciones genéticas, ya que la carcinogénesis en estos tumores está mediada principalmente por las oncoproteínas virales E6 y E7^{1,4,5,30}.

1.3.2. Tumores asociados a carcinógenos

La mayor parte de los CECC VPH-negativos están asociados a la exposición a algún agente carcinogénico, principalmente a aquellos derivados del tabaco. La activación metabólica de los carcinógenos da lugar a la formación de metabolitos reactivos, que, si no se excretan, pueden causar daño en el DNA generando aductos de DNA. Cuando este daño no puede ser reparado de manera adecuada, se convierte en daño permanente en forma de alteraciones genéticas como mutaciones, deleciones o amplificaciones. Son frecuentes las mutaciones en genes supresores de tumores como *TP53* y *CDKN2A*. La acumulación de alteraciones genéticas en determinadas vías de señalización, fundamentales para el normal funcionamiento de las células, inicia el desarrollo tumoral, contribuye a su progresión y es responsable del mal pronóstico del CECC no asociado a VPH. La probabilidad de que los carcinógenos den lugar a estos cambios genéticos y a la transformación neoplásica depende del balance existente entre su activación metabólica y su excreción y la reparación del DNA (**Figura 8**)¹.

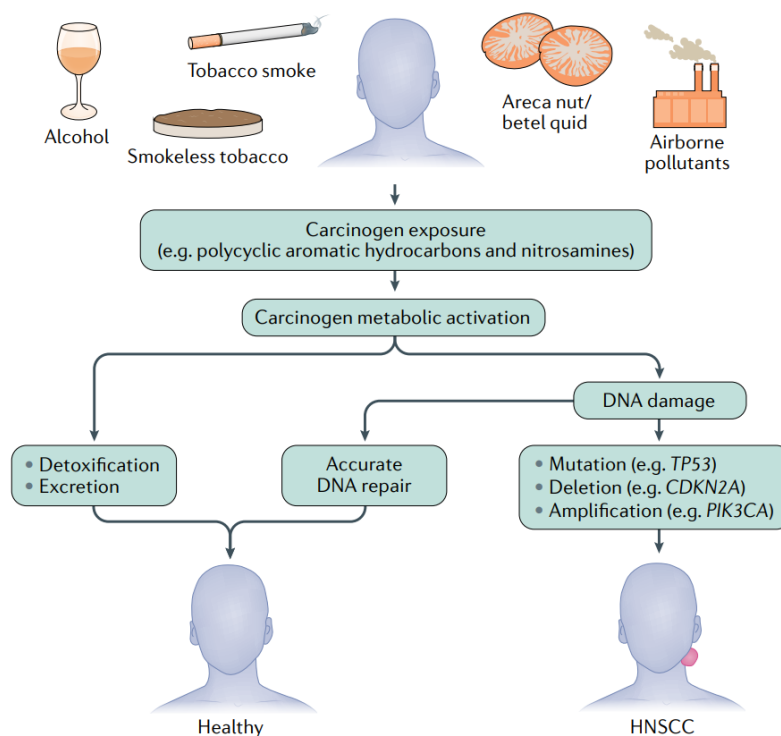


Figura 8. Proceso de desarrollo tumoral en CECC VPH-negativo asociado a carcinógenos. Obtenido de Johnson *et al.*, 2020¹.

El consumo excesivo de alcohol es otro factor de riesgo importante, cuya relación con el tabaco en la promoción de la carcinogénesis es sinérgica. Esto es así porque el alcohol es un solvente para los carcinógenos, aumentando la exposición de las células

epiteliales a estos. Además, el alcohol se metaboliza a acetaldehído, un compuesto que forma aductos de DNA^{5,69,70}.

1.4. Alteraciones moleculares

El uso extensivo de técnicas de secuenciación de nueva generación y de otras técnicas masivas ha permitido identificar las principales vías de señalización implicadas en el desarrollo de CECC, que se detallan a continuación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que todavía existen mecanismos moleculares no conocidos que podrían contribuir a una clasificación más precisa con implicaciones clínicas de esta entidad tan heterogénea^{4,71}.

1.4.1. La vía de señalización de EGFR

EGFR es una glicoproteína transmembrana que actúa como receptor de la superficie de la célula y pertenece a la subfamilia de receptores HER/ErbB. Se ha descrito que EGFR está mutado o amplificado en el 80% de los casos de CECC. Además, su alteración se ha asociado a un peor pronóstico. La vía de señalización de EGFR activa otras muchas vías de señalización que también están implicadas en el desarrollo del cáncer⁷².

EGFR se puede unir a distintos ligandos de la familia HER, como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la anfiregulina y el factor de crecimiento transformante-alfa (TGF- α), entre otros, induciendo una cascada de transducción de señales que lleva a la proliferación tumoral, así como a la invasión, a la angiogénesis y a la metástasis, determinando en gran medida la progresión de la enfermedad. En CECC se han descrito diversas aproximaciones para activar este receptor. Por ejemplo, las células aumentan la producción de anfiregulina y TGF- α en respuesta al humo de tabaco⁷³.

Por otra parte, EGFR puede translocarse al núcleo celular, presentando otras funciones en este compartimento, actuando como factor de transcripción a través de la unión a diversos promotores y cofactores de transcripción. Esta translocación puede potenciar la oncogénesis y la invasión, estando asociada con un peor pronóstico y con resistencia terapéutica. Se ha descrito que puede estar mediada por diversos factores, como el VEB, la radiación, la acción de algunos ligandos de EGFR y de quinasas de la familia Src y por algunos anticuerpos monoclonales dirigidos a EGFR como cetuximab^{73,74}.

1.4.2. La vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR

La vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR está activada en más del 90% de los casos de CECC. El gen *PI3KCA*, que codifica la proteína PI3K presenta mutaciones de ganancia de función en el 16-25% de los casos, con mayor frecuencia en los tumores asociados a VPH, que rara vez presentan mutaciones en *TP53*, el gen más frecuentemente mutado en CECC⁷⁴⁻⁷⁷. Estas mutaciones conducen a la activación de esta vía de señalización a través de la acción de la serina/treonina quinasa mTOR, formada por mTORC1 y mTORC2, y de la proteína AKT fosforilada. Además, la activación de PI3K puede estar mediada por EGFR⁷¹.

La activación de esta cascada de señalización celular promueve el crecimiento, la proliferación y la supervivencia celular, así como la reorganización del citoesqueleto, y se asocia con una mayor resistencia al tratamiento, mediada por una potenciación en los mecanismos de reparación del DNA^{71,78}.

Por otra parte, esta vía de señalización tiene un papel relevante en el CECC asociado a VEB, pudiendo ser activada por proteínas de membrana de este virus⁷⁹.

1.4.3. La vía de señalización de MAPK

La vía de señalización de MAPK tiene mucha importancia en la proliferación de las células tumorales, en la diferenciación, en la angiogénesis y en la metástasis y su activación se ha asociado a una mayor resistencia al tratamiento. Algunas proteínas relevantes en esta vía de señalización son RAS, RAF, MEK y ERK, siendo todas ellas proteínas de tipo quinasa^{80,81}.

Esta vía de señalización está mutada en aproximadamente el 18% de los CECC, siendo los genes más frecuentemente mutados *BRAF*, *HRAS*, *KRAS* y *ERK*. Las mutaciones en estos genes llevan a una activación constitutiva de las proteínas^{71,82}.

1.4.4. Vía de señalización JAK/STAT

La vía de señalización de JAK/STAT ha sido asociada a proliferación celular, angiogénesis, evasión del sistema inmune, resistencia terapéutica y mal pronóstico en CECC. Sin embargo, las mutaciones en los genes que participan en esta cascada de señalización son raras^{71,83}.

Las proteínas de la familia STAT, en respuesta a ciertas citoquinas y factores de crecimiento, son fosforiladas, forman homo o heterodímeros y se translocan al núcleo celular donde actúan como factores de transcripción. STAT3 tiene una acción inmunosupresora a través del incremento de la producción de citoquinas como TGF-β1,

1.4.6. La vía de señalización p53/pRb

El gen supresor de tumores TP53 es el más recurrentemente mutado en CECC y su alteración se ha asociado con progresión tumoral, recurrencia y resistencia al tratamiento. Los tumores asociados a VPH se asocian con la degradación de p53 por la oncoproteína vírica E6, la inactivación de pRb por la oncoproteína vírica E7 y un aumento de la expresión de p16^{INK4a} como efecto compensatorio. Por este motivo, TP53 no suele estar mutado en este tipo de tumores. Sin embargo, los tumores no asociados a VPH presentan de manera frecuente mutaciones en TP53 y una expresión disminuida del CDKN2A, que codifica p16^{INK4a} 65. Se ha descrito que la mutación de TP53 es en un evento temprano en la carcinogénesis del CECC VPH-negativo⁴. La proteína p53 es un factor de transcripción que mantienen la estabilidad genómica y controla el ciclo celular y la reparación del DNA, así como la senescencia y la apoptosis. También son importantes para el desarrollo tumoral otros genes de la misma familia que TP53, como TP63 y TP73⁸⁹.

Por otra parte, el gen supresor tumoral RB, tiene un papel muy relevante en la carcinogénesis del CECC, debido a su función reguladora del ciclo celular. La proteína pRB se une a la oncoproteína vírica E7, permitiendo la liberación del factor de transcripción E2F y dando lugar a una proliferación celular descontrolada. Cuando se activa p53 ante una infección vírica o la inducción de daño en el DNA, aumenta la expresión de p21, que da lugar a la formación del complejo pRB-E2F y a el consecuente arresto del ciclo celular. Cuando este mecanismo falla, debido a alteraciones genéticas o la acción de oncoproteínas víricas, se pierde el control del ciclo celular dando lugar a un incremento de la proliferación y al desarrollo tumoral^{71,89}.

1.4.7. La vía de señalización de NF-κB

Los factores de transcripción de la familia NF-κB tienen un papel importante en la respuesta inmune innata y adaptativa, en el desarrollo y también en la tumorigénesis⁹⁰. Ha sido descrito que algunos agentes carcinogénicos, como el tabaco, el alcohol o la radiación activan la señalización mediada por NF-κB. Esta activación también se ha asociado con la infección por VEB y parece tener importancia en el desarrollo del carcinoma nasofaríngeo asociado a VEB, mediante la inmunosupresión del microambiente tumoral, el mantenimiento de las características de las células madre y la reprogramación metabólica^{35,91,92}. También se ha asociado la presencia de algunos polimorfismos con el riesgo a desarrollar CECC⁹³.

La vía de señalización canónica de NF-κB depende de receptores de citoquinas como TNFR, IL-1R o TLR4⁹⁴. Los dímeros de NF-κB se unen a proteínas inhibitorias IκB

en estado de reposo, pero son activados mediante la fosforilación del complejo IKK, formado por las quinasas IKK α e IKK β y por la subunidad reguladora IKK γ (NEMO), permitiendo la translocación nuclear⁹⁵. La vía de señalización no canónica se activa mediante los ligandos CD40 y LT- β y está mediada por la formación del complejo p52-RelB mediante la acción de IKK α y p100. Los genes activados por NF- κ B participan en la proliferación, la supervivencia, la apoptosis, la migración, la angiogénesis y el control del ciclo celular^{71,96}.

Además, la cascada de señalización de NF- κ B interacciona con otras vías de señalización mencionadas anteriormente^{94,97–99}. En la **Figura 10** se recoge un esquema de las vías de señalización de p53/pRB y NF- κ B en CECC.

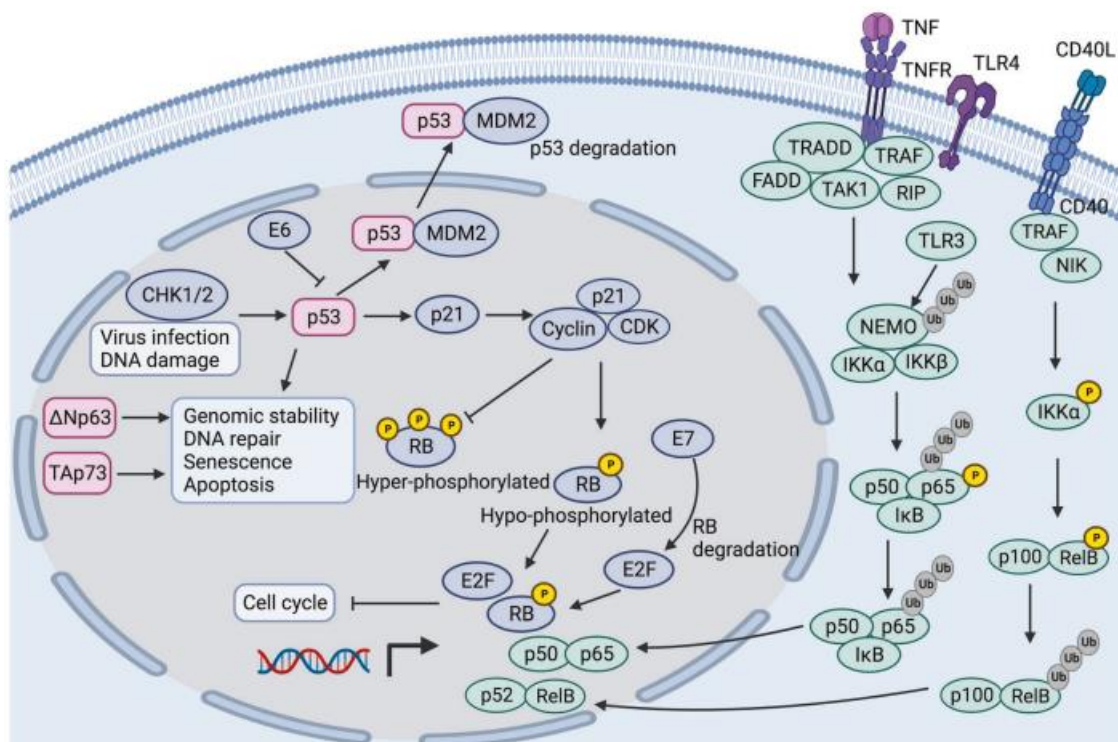


Figura 10. Las vías de señalización de p53/pRB y NF- κ B en CECC. Obtenido de Li *et al.*, 2023⁷¹.

1.4.8. Las vías de señalización Wnt/ β -catenina y Notch

La vía de señalización Wnt/ β -catenina promueve la proliferación de las células tumorales, mantiene el fenotipo de indiferenciación de las células madre y aumenta la capacidad invasiva del tumor en CECC¹⁰⁰. En esta vía de señalización participan ligandos extracelulares, receptores transmembrana, compuestos intracelulares y factores de transcripción. El ligando Wnt se une a receptores de la membrana celular, regulando la señalización celular mediada por la proteína intracelular β -catenina, que cuando está activada se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción¹⁰¹.

La señalización de Wnt/ β -catenina está estrechamente relacionada con la señalización mediada por Notch, en la que participan cuatro receptores Notch y cinco ligandos diferentes. β -catenina activa la señalización de Notch a través de la inducción de la expresión de estos ligandos^{102,103}. Esta interacción se muestra en la **Figura 11**.

Se ha descrito que Notch1 tiene un papel importante en la recurrencia tumoral y en la metástasis. El gen que codifica esta proteína presenta mutaciones inactivantes en el 17-26% de los casos de CECC, tanto en tumores VPH-positivos como VPH-negativos¹⁰⁴. También se ha descrito una sobreexpresión de los receptores Notch en este tipo de cáncer, lo que sugiere que la alteración de esta señalización, en cualquier sentido, puede contribuir al desarrollo tumoral. De este modo, *NOTCH1* juega un papel dual como oncogen o gen supresor de tumores en CECC¹⁰⁵.

1.4.9. Otras vías de señalización

Además de las vías de señalización mencionada previamente, existen otras que están alteradas con cierta frecuencia en CECC y que pueden tener un papel importante en el desarrollo tumoral. Entre estas está la señalización mediada por VEGF, un factor angiogénico; por RET, una proteína tirosina quinasa; NRF2; Hippo o Sonic-Hedgehog. Todas estas vías de señalización controlan procesos fundamentales para las células y su alteración lleva al desarrollo y progresión del cáncer. Además, existen muchas interacciones entre estas vías de señalización y otras descritas previamente^{106–110}.

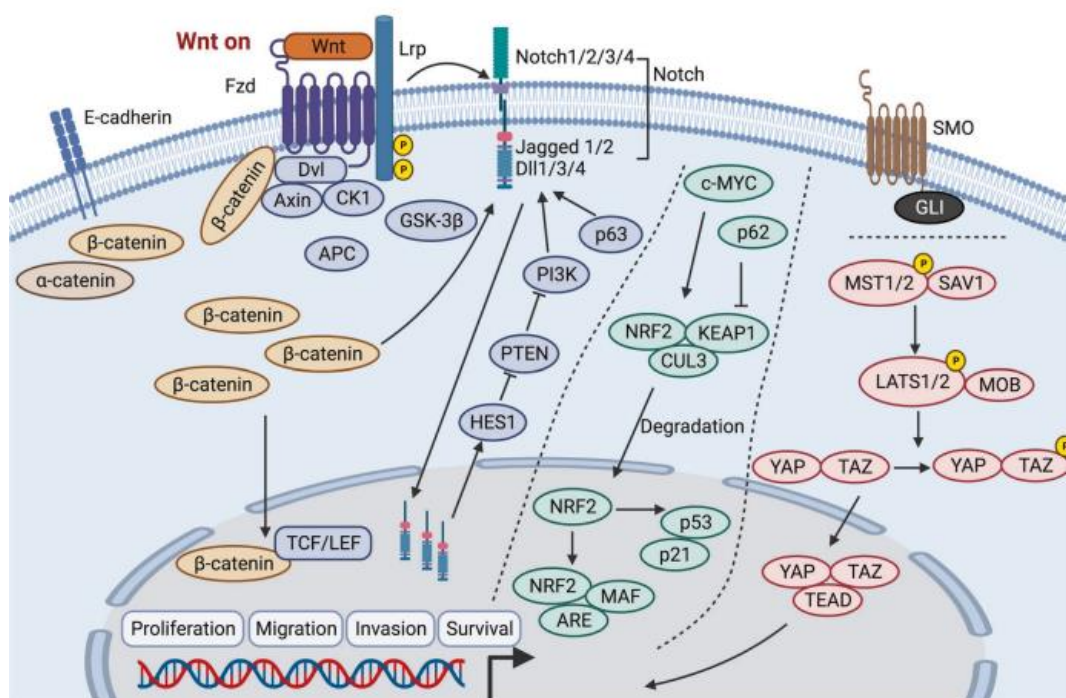


Figura 11. Las vías de señalización de Wnt/ β -catenina, Notch, NRF2, Hippo y Sonic-Hedgehog en CECC. Obtenido de Li *et al.*, 2023⁷¹.

A pesar de los avances que se han conseguido en la caracterización de las alteraciones moleculares implicadas en CECC todavía no ha sido posible establecer subgrupos moleculares que se correlacionen con un perfil clínico, por lo que es necesaria la realización de más estudios.

1.5. Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones citogenéticas causan muchas de las aberraciones genéticas asociadas a CECC, debido a que interrumpen el correcto funcionamiento de numerosas vías de señalización. Es necesario tener en cuenta estas vías de señalización que se ven afectadas por las alteraciones citogenéticas para poder entender mejor sus efectos en el desarrollo tumoral, la respuesta a terapia y el pronóstico¹¹¹. Actualmente, el número de CNA se emplea para subclasificar el CECC no asociado a VPH, lo cual remarca la importancia de este tipo de alteraciones en esta entidad^{4,60}.

Actualmente se han descrito las siguientes alteraciones citogenéticas como aquellas más frecuentes en CECC, aunque su caracterización no es muy completa: ganancias en 5p14-15, 8p11-14 y 20q12-13; ganancias o amplificaciones en 3q26, 7p11, 8q24 y 11q13 y pérdidas en 3p, 4q35, 5q12, 8p23, 9p21-24, 11q14-23, 13q12-14, 18q23 y 21q22¹¹¹.

Por otra parte, los estudios del modelo de desarrollo tumoral que se han realizado hasta el momento, principalmente en el CECC localizado en la cavidad oral, han permitido establecer la secuencialidad de algunas alteraciones citogenéticas, concluyendo que las CNA en los brazos cromosómicos 3p, 17p y 9p son eventos tempranos, mientras que las CNA en 11q, 13q, 14q, 6p, 8p, 10q y 4p son eventos tardíos en el proceso carcinogénico. Esto sugiere que los eventos tempranos podrían ser tenidos en cuenta para predecir la malignización de células hiperplásicas o displásicas^{1,4,58}. Diversos estudios han analizado el papel de la pérdida de 3p en CECC, concluyendo que los tumores con esta alteración son una entidad biológica diferente dentro del CECC VPH-negativo, con peor pronóstico^{112,113}.

A nivel de cariotipo, los CECC son bastante complejos, presentando de manera frecuente triploidía o tetraploidía y estando formados por distintos clones celulares con distintas anomalías cromosómicas tanto a nivel numérico como a nivel estructural¹¹⁴.

Es necesaria una mayor profundización en la caracterización del papel de las alteraciones citogenéticas en CECC, ya que podrían ser empleadas como biomarcadores diagnósticos, pronósticos o de respuesta a determinados tratamientos,

lo que podría tener una repercusión importante en la morbilidad y mortalidad y llevar a cabo una medicina de precisión en CECC. Actualmente, no son tenidas en cuenta para establecer el diagnóstico o decidir el tratamiento de los pacientes^{60,111}.

1.6. Diagnóstico y estadíaje

Los pacientes con CECC en estadios tempranos son asintomáticos o presentan síntomas leves, mientras que en estadios más avanzados presentan un abanico de manifestaciones clínicas que depende de la localización tumoral. En los tumores localizados en la cavidad oral o en el labio es habitual la presencia de masas y úlceras que causan dolor, sangrado, disfagia y pérdida de peso. En el caso de los tumores de laringe, la sintomatología de los pacientes varía en función de su sublocalización, estando entre ellos la disnea, la disfagia, la odinofagia y la otalgia refleja. Los tumores en la glotis se diagnostican habitualmente en estadios tempranos ya que estos pacientes presentan disfonía y tos persistente, mientras que los tumores supraglóticos se diagnostican en estadios muy avanzados, presentando de manera frecuente adenopatías cervicales. En cuanto a las neoplasias originadas en la orofaringe las manifestaciones clínicas más comunes incluyen disfagia, odinofagia, otalgia y trismus. Por otra parte, las localizadas en la hipofaringe causan frecuentemente disfagia, otalgia, disfonía y adenopatías. En el caso de los tumores de la nasofaringe, los pacientes refieren mayoritariamente otitis, obstrucción nasal, epistaxis y parálisis del nervio craneal. Por último, los tumores de la cavidad nasal o senos paranasales se asocian con sinusitis, rinorrea, obstrucción nasal unilateral y epistaxis^{1,115-118}.

Existen diversos sistemas de clasificación para el CECC, que dependen de distintos parámetros. Por un lado, el grado histológico permite establecer el grado de semejanza del tejido tumoral con el tejido normal, teniendo en cuenta la morfología y la organización celular. Los tumores se clasifican en grados del 1 al 4, siendo el grado 1 el que define tumores de mayor diferenciación y mayor parecido con el tejido normal y el grado 4 el que define un tejido tumoral indiferenciado no estructurado, con células con morfología anormal¹¹⁹⁻¹²².

Por otra parte, existen distintos sistemas de estadíaje basados en las características del tumor y el nivel de diseminación. La clasificación TNM es el método establecido por el *International American Joint Committee on Cancer* y la *International Union Against Cancer* y se emplea habitualmente en la práctica clínica para evaluar el tumor en el momento del diagnóstico. Se basa en el análisis de tres parámetros: el tamaño y extensión de la masa tumoral primaria (T), el grado de afectación ganglionar (N) y la

presencia o ausencia de metástasis (M) y establece cinco categorías (estadio 0-estadio IV). Los valores establecidos para cada categoría de los parámetros T, N y M dependen del tipo de tumor, habiendo diferencias entre las distintas localizaciones del CECC. Además, desde hace pocos años, se hace una distinción entre la evaluación de estos parámetros desde un punto de vista clínico y desde un punto de vista patológico. Actualmente, desde la última actualización, correspondiente con la octava edición, la clasificación TNM tiene en cuenta la distinción entre los carcinomas escamosos orofaríngeos VPH-positivo (**Tabla 1**) y los carcinomas escamosos de causa desconocida asociados a nódulos cervicales. Los sarcomas de tejidos blandos de cabeza y cuello se consideran también una entidad independiente. De este modo, el sistema se va revisando y actualizando en función de la información conocida sobre cada tipo de cáncer y su repercusión clínica^{119,121,123}.

Tabla 1. La clasificación TNM clínica y patológica para el carcinoma escamoso de orofaringe asociado a VPH (octava edición). Obtenido de Huang S.H. *et al.*, 2017.

HPV+ OPC	Clinical stage			Pathologic stage					
Category	T	N	M	T	N	M			
Stage I	T1, T2	N0: no regional LNs N1: ipsilateral LNs	M0	T1, T2	N0: no regional LNs N1: 1–4 LNs	M0			
Stage II	T1, T2	N2: bilateral or contralateral LNs	M0	T1, T2	N2: ≥ 5 LNs	M0			
	T3	N0: no regional LNs N1: ipsilateral LNs N2: bilateral or contralateral LNs	M0	T3, T4	N0: no regional LNs N1: 1–4 LNs	M0			
Stage III	T4	Any N	M0	T3, T4	N2: ≥ 5 LNs	M0			
	Any T	N3: >6.0 cm LN(s)	M0						
Stage IV	Any T	Any N	M1	Any T	Any N	M1			
Stage grid for non-metastatic (M0) HPV+ OPC									
Clinical stage group				Pathologic stage group					
cTcN	T1	T2	T3	T4	pTpN	T1	T2	T3	T4
N0	I	I	II	III	N0	I	I	II	II
N1	I	I	II	III	N1	I	I	II	II
N2	II	II	II	III	N2	II	II	III	III
N3	III	III	III	III	Not applicable				
LN lymph node									

LN lymph node

La última actualización de este sistema de estadiaje ha traído también otras novedades. Se han cambiado las clasificaciones T y M del carcinoma nasofaríngeo y, en el caso del CECC de cavidad oral, se ha incluido el parámetro “profundidad de invasión (DOI)” en la categoría T. Para el CECC no asociado a VPH se ha incorporado la “extensión extranodal (ENE)” como variable a tener en cuenta en la categoría N. Todos estos cambios pretenden aumentar la precisión en el estadiaje realizado en el momento del diagnóstico con el fin último de optimizar el manejo clínico y, en consecuencia, el pronóstico de este tipo de cáncer¹²³.

En el caso del CECC, la mayor parte de los pacientes son diagnosticados en estadios localmente avanzados, que se corresponden con los estadios III y IV no metastásicos (IVA y IVB) de la clasificación TNM^{124,125}.

2. Tratamiento del carcinoma escamoso de cabeza y cuello

El tratamiento del CECC ha evolucionado de forma muy importante en las últimas décadas, a medida que se ha ido avanzando en su caracterización molecular y, al mismo tiempo, en las opciones terapéuticas disponibles^{71,89}. En la **Figura 12** se recoge una línea temporal con los hitos más significativos en lo referido al CECC, siendo preciso señalar la relevancia de la inmunoterapia y de la terapia dirigida, ya que hasta hace poco tiempo las opciones de tratamiento de este tipo de cáncer estaban limitadas a la radioterapia y a la quimioterapia. Asimismo, el microbioma y la hipoxia están cobrando mucha importancia en el CECC y se espera que esto tenga repercusiones terapéuticas en los años venideros.

Sin embargo, a pesar de todos estos avances, continúa habiendo subgrupos de pacientes que presentan fallo terapéutico precoz y mal pronóstico debido, principalmente, a la resistencia del tumor al tratamiento¹²⁶. Por este motivo, es muy importante seguir ampliando el abanico de opciones terapéuticas disponibles para manejar el CECC y conseguir establecer biomarcadores de respuesta que permitan la aplicación de una medicina de precisión.

Asimismo, es preciso optimizar la combinación, la dosis y la secuencialidad de las terapias que se han probado eficaces en CECC hasta el momento, para que la tasa de respuesta sea óptima con una toxicidad mínima. Actualmente, se están llevando a cabo diversos ensayos clínicos que comparan distintas estrategias terapéuticas, con distintas combinaciones de los tratamientos actuales y distinta secuencialidad, así como con nuevas opciones terapéuticas para el CECC, por lo que se esperan avances y actualizaciones en los próximos años.

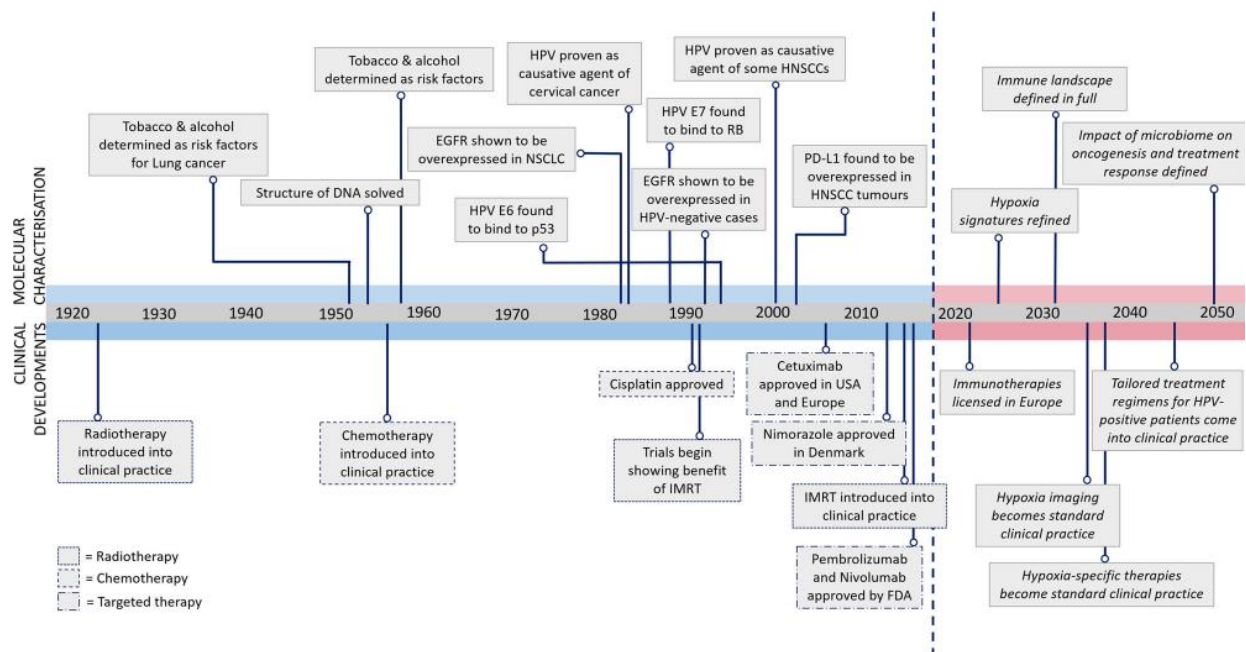


Figura 12. Línea temporal de los avances en la caracterización molecular y en las estrategias terapéuticas del CECC. Obtenido de Alsahafi *et al.*, 2019⁸⁹.

2.1. Terapias estandarizadas

El abordaje del CECC es multidisciplinar y depende tanto de la localización del tumor primario como del nivel de avance de la enfermedad determinado a través del estadiaje³. A continuación, se abordará el tratamiento del carcinoma escamoso de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe, excluyendo los tumores de las fosas nasales, glándulas salivares y nasofaringe, que presentan un enfoque terapéutico diferente.

2.1.1. Enfermedad temprana: estadios clínicos I y II

En el caso de un diagnóstico temprano de una enfermedad local, que se da en aproximadamente el 30% de los casos, el tratamiento se basa en la cirugía y/o en la radioterapia (RT)¹²⁵. La cirugía, la radioterapia conformada tridimensional y la braquiterapia han demostrado una efectividad parecida, con un control locorregional semejante y tasas de supervivencia asociadas parecidas. De este modo, la estrategia terapéutica debe ser consensuada por un equipo multidisciplinar, teniendo en cuenta las características del tumor concreto, los deseos del paciente y las posibles consecuencias del tratamiento a nivel funcional. En cuanto a la cirugía, en función de la localización se puede optar por cirugía abierta o por cirugía transoral mínimamente invasiva. En los tumores de cavidad oral y de orofaringe se deben tratar los ganglios linfáticos cervicales con radiación profiláctica o disección electiva del cuello. En general, el pronóstico de estos pacientes es bueno^{3,127}.

2.1.2. Enfermedad localmente avanzada: estadios clínicos III, IVa y IVb

Más del 60% de los pacientes con CECC son diagnosticados en estadios localmente avanzados¹²⁵. Este grupo es el más heterogéneo, ya que incluye tumores tanto resecables como irresecables, de tal modo que se pueden distinguir dos enfoques terapéuticos principales, basados en la cirugía o en la RT. La resecabilidad tumoral la debe determinar un equipo multidisciplinar atendiendo a criterios anatómicos, las posibilidades de conseguir márgenes adecuados, las secuelas funcionales y estéticas, las comorbilidades del paciente y las posibilidades de curación³.

El tratamiento basado en la cirugía de los pacientes con CECC localmente avanzado puede ir seguido de distintos tratamientos adyuvantes, incluyendo la radioterapia de intensidad modulada (RTIM), la radioterapia convencional y la quimiorradioterapia concomitante con cisplatino (QRTC). Sin duda alguna, la introducción de la QRTC ha supuesto uno de los mayores avances en el CECC localmente avanzado, demostrando más beneficios que los tratamientos por separado o la administración secuencial de los mismos^{3,128}.

En el caso de los CECC considerados irresecables el tratamiento se basa en la radioterapia. Una de las opciones terapéuticas es la QRTC, siendo preferible la RTIM con una dosis de entre 44 y 50 Gy en caso de radiación electiva de sitios de riesgo y de entre 66 y 70 Gy para el tumor primario y los nódulos linfáticos implicados. El agente quimioterápico estándar es el cisplatino, pero en pacientes con algún tipo de contraindicación (como neuropatía, nefropatía, enfermedad cardíaca o hipoacusia) puede administrarse como tratamiento alternativo el cetuximab, un anticuerpo monoclonal frente a EGFR, que también ha demostrado buenos resultados³.

Otra opción de tratamiento habitual en la práctica clínica para el CECC localmente avanzado es la terapia secuencial con quimioterapia de inducción (QTI) seguida de QRTC o radioterapia. La elección de esta opción puede verse influenciada por la presencia de comorbilidades del paciente, un gran volumen tumoral o una elevada tasa de crecimiento tumoral^{3,129}. La QTI más recomendada es el régimen TPF, que incluye cisplatino, docetaxel y 5-fluorouracilo (5-FU). Este tratamiento ha supuesto una mejora en la tasa de respuesta, estando entre sus mayores limitaciones la toxicidad potencial, que puede comprometer el tratamiento posterior, y la existencia o desarrollo de resistencia en algunos subgrupos de pacientes que actualmente no se pueden identificar antes de definir la estrategia terapéutica^{130,131}. Estudios recientes sugieren la incorporación del cetuximab a la QTI en CECC para reducir la toxicidad del tratamiento^{132,133}.

En el caso de los CECC VPH-positivos hay diversos ensayos clínicos de desescalada y desintensificación terapéutica, ya que están asociados a un mejor pronóstico y podría no ser necesario mantener los regímenes terapéuticos estandarizados, con su correspondiente toxicidad y repercusión en la calidad de vida, para obtener la misma eficacia. Sin embargo, esta todavía es una cuestión abierta y se debe mantener el estándar terapéutico hasta que se analicen detenidamente los resultados de estos ensayos clínicos^{89,134–137}. Por otro lado, en los tumores originados en la laringe o en la hipofaringe se debe considerar la cirugía con preservación del órgano junto con QRTC, RT o QTI, estando siempre la opción de un resecado quirúrgico total en caso de que sea necesario¹³⁸.

2.1.2.1. Régimen terapéutico TPF

El régimen terapéutico TPF, basado en la combinación de cisplatino, 5-FU y docetaxel, administrado como QTI, ha supuesto un gran avance terapéutico en el CECC localmente avanzado y se ha convertido en una opción de tratamiento ampliamente empleada. Inicialmente, se demostró el efecto beneficioso de la combinación del tratamiento con cisplatino y 5-FU pero, la incorporación de un taxano, como el docetaxel, resultó presentar una mejoría importante en la supervivencia global y en el periodo libre de enfermedad en pacientes con CECC irresecable localmente avanzado¹³⁹. De este modo, la combinación de tres agentes quimioterápicos con efectos celulares diferentes consigue una mejor tasa de respuesta. El mecanismo de acción de estos tres fármacos se resume en la **Figura 13**.

El cisplatino induce la citotoxicidad de las células tumorales a través de su unión al DNA, a través de las bases púricas, tanto nuclear como mitocondrial, causando daño e impidiendo su adecuada reparación. El cisplatino puede entrar en las células a través de transportadores de cobre de la membrana. Las bajas concentraciones de cloruro en el citosol celular permiten que el cisplatino actúe. El daño en el DNA inducido por este fármaco lleva a la permeabilización de la membrana exterior de la mitocondria, siendo posible la liberación del citocromo c, una proteína mitocondrial, al citosol. El citocromo c activa una señalización celular que lleva a la inducción de la apoptosis y la consecuente muerte de la célula tumoral. Además, el cisplatino se puede unir a moléculas citoplasmáticas, como GSH y MT, dando lugar a la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), que también causan daño en el DNA y contribuyen a la permeabilización de la membrana mitocondrial externa^{130,140}.

El 5-FU es un fármaco antimetabolito que se usa de manera habitual para tratar distintos tipos de cáncer. El 5-FU puede entrar en las células a través de los mecanismos

de transporte del uracilo, debido a la analogía en su estructura, y, una vez en el citoplasma, se convierte en tres metabolitos primarios activos: monofosfato de fluorodesoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodesoxiuridina (FdUTP) y trifosfato de fluorouridina (FUTP). El FdUMP puede inhibir la timidilato sintasa, una enzima metiltransferasa necesaria para sintetizar timidilato, formar desoxitimidina 5'-trifosfato y, en consecuencia, sintetizar las bases del DNA y reparar esta molécula. Por otro lado, el FdUTP se puede incorporar de manera errónea al DNA, causando daño. Por último, el FUTP se incorpora al RNA, causando daño y alterando su procesamiento y su función. Todo esto conlleva a la apoptosis y a la posterior muerte de la célula tumoral^{141,142}.

Finalmente, los taxanos son agentes antimitóticos que presentan un efecto antineoplásico y que se emplean en el tratamiento de distintos tipos de cáncer. El paclitaxel fue el primer taxano aprobado para su uso clínico. Su mecanismo de acción se basa en su unión a la subunidad β de los microtúbulos, promoviendo el ensamblaje de la tubulina y suprimiendo la dinámica de los microtúbulos, impidiendo su despolimerización. Esto produce el bloqueo de la mitosis y de la segregación cromosómica, limitando así la división celular y promoviendo la apoptosis¹³⁰.

Además, se conoce que el paclitaxel induce apoptosis tanto a través de la vía extrínseca como de la vía intrínseca mediante la producción de ROS, la modulación de la función mitocondrial, la activación de la inmunidad antitumoral y de su bien definido efecto sobre el ciclo celular¹⁴³. Por otra parte, se ha demostrado que presenta más efectos celulares, como una inducción del proceso de autofagia¹⁴³⁻¹⁴⁵.

El docetaxel es un análogo del paclitaxel que también inhibe la despolimerización de los microtúbulos. La estructura de ambos fármacos es muy similar, al igual que su mecanismo de acción, aunque presentan algunas diferencias. El docetaxel presenta una mayor afinidad de unión a la tubulina. Sin embargo, a nivel clínico, las tasas de respuesta a paclitaxel y docetaxel en CECC son muy semejantes, habiendo sido publicado un 43% y un 44%, respectivamente¹⁴⁶. En el régimen TPF, empleado en CECC, se administra docetaxel, aunque hay diversos estudios que prueban la eficiencia del régimen PPF, con paclitaxel en lugar de docetaxel^{13,130}.

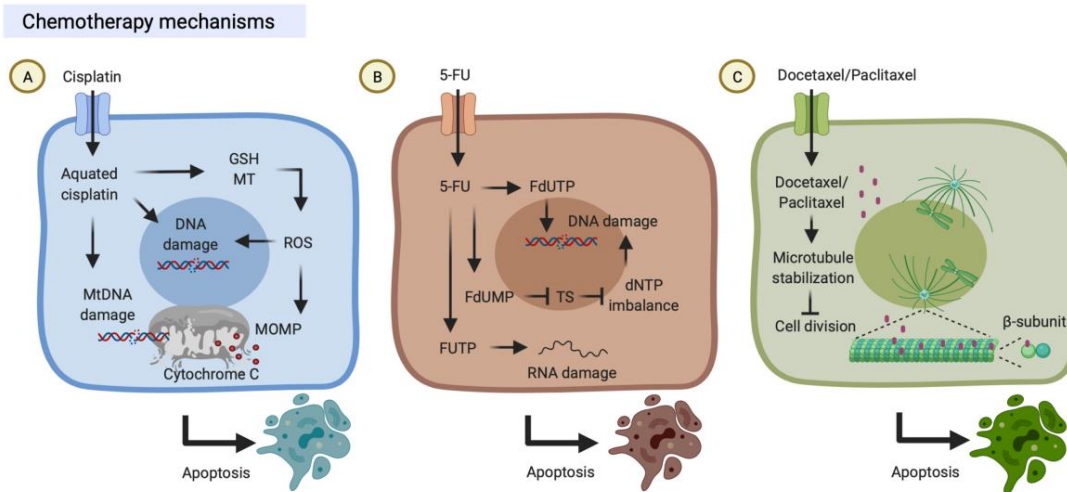


Figura 13. Mecanismo de acción de los agentes quimioterápicos incluidos en el régimen TPF. A) Cisplatino; B) 5-FU; C) Taxanos (docetaxel y paclitaxel). Obtenido de Kanno *et al.*, 2021¹³⁰.

2.1.3. Enfermedad metastásica: estadio clínico IVc

Las opciones terapéuticas para el CECC metastásico son limitadas. El pronóstico de estos pacientes es malo y mantener la calidad de vida de los pacientes es un objetivo prioritario, pudiendo priorizar la finalidad paliativa a la curativa en función del caso. Un equipo multidisciplinar debe evaluar el caso concreto para definir la estrategia terapéutica, considerando la inclusión del paciente en un ensayo clínico³. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la llegada de la inmunoterapia ha permitido ampliar el abanico de opciones de tratamiento y mejorar considerablemente la respuesta y el pronóstico de este grupo de pacientes¹⁴⁷. Asimismo, la existencia de terapias dirigidas, como el cetuximab, que se une a EGFR, también han supuesto un gran avance.

Desde que se identificó la sobreexpresión de PDL1, un ligando que se une al receptor PD1, presente en las células T, para bloquear su activación, en CECC se ha evaluado el tratamiento con distintos anticuerpos monoclonales dirigidos a impedir esta interacción, como pembrolizumab y nivolumab. Este enfoque terapéutico se basa en evitar que las células tumorales evadan al sistema inmune, ya que evitando la unión entre PDL1 y PD1 las células T son capaces de reconocer las células tumorales. Esta opción terapéutica comenzó consiguiendo buenos resultados en CECC refractario a platinos. Posteriormente, el pembrolizumab en monoterapia o combinado con quimioterapia ha demostrado una mejora significativa en la supervivencia global como primera línea de tratamiento en el CECC metastásico, estableciéndose así un nuevo estándar de tratamiento y suponiendo un hito en los avances terapéuticos del CECC. La combinación de pembrolizumab con quimioterapia mejora la respuesta, pero aumenta la toxicidad, por lo que debe realizarse una evaluación del balance riesgo/beneficio en

cada caso concreto. Cuando el tumor no expresa PDL1, una de las terapias de uso más estandarizado es el régimen EXTREME, formado por platinos, 5-FU y cetuximab^{147,148}. Publicaciones recientes han permitido identificar un potencial biomarcador de respuesta para los inhibidores del *checkpoint* inmune PDL1-PD1 en CECC, que consiste en un índice de pronóstico basado en genes del sistema inmune, con resultados prometedores hasta el momento¹⁴⁹.

2.1.4. Enfermedad recurrente

Como ya se ha mencionado previamente, la mayor parte de los casos de CECC se diagnostican en estadios localmente avanzados. El tratamiento en esta situación tiene una finalidad curativa, pero existen subgrupos de paciente que presentan fallo terapéutico precoz y progresión de la enfermedad o recurrencias, conllevando todo ello a un mal pronóstico. Al menos la mitad de los pacientes presentan recidivas locorregionales o a distancia que suelen detectarse en los primeros dos años de tratamiento. Actualmente, la caracterización molecular del tumor, más allá de la presencia o ausencia de VPH, no se tiene en cuenta para las decisiones terapéuticas, ya que no existen biomarcadores de respuesta que puedan predecir el resultado del tratamiento. De este modo, muchos pacientes son sometidos a tratamientos agresivos, con su toxicidad asociada e importantes efectos secundarios, cuando no pueden beneficiarse de ellos. Este es uno de los principales problemas actuales en el manejo del CECC^{1,3,130,147}.

En el caso del CECC recurrente, un equipo multidisciplinar debe valorar la mejor estrategia terapéutica, considerando la resecabilidad cuando es posible, así como la RT, la quimioterapia o el uso de terapias dirigidas con EGFR como diana terapéutica (como cetuximab u inhibidores tirosina quinasa como erlotinib o gefitinib). En los últimos años, gracias al desarrollo de la inmunoterapia y a la realización de múltiples ensayos clínicos, los inhibidores del *checkpoint* inmune como pembrolizumab se han convertido en muchos casos en el tratamiento de elección en CECC recurrente, en solitario o en combinación con quimioterapia, al igual que en el CECC metastásico. Esta nueva opción terapéutica ha conseguido mejorar considerablemente el pronóstico del CECC recurrente^{147,148,150,151}. Se espera que el uso de nuevas terapias dirigidas llegue a la clínica del CECC a lo largo de los años venideros, teniendo especial importancia la hipoxia y el microambiente tumoral⁸⁹.

2.1.5. Toxicidad al tratamiento

La toxicidad al tratamiento es uno de los principales problemas en el manejo clínico del CECC. El hecho de que en la mayor parte de los casos el diagnóstico no se realice

en los primeros estadios del desarrollo tumoral ha llevado a la intensificación de los tratamientos y al aumento de regímenes concomitantes, con el fin de mejorar la tasa de respuesta, el pronóstico y la supervivencia de los pacientes con CECC. Esto ha conducido a un aumento de la toxicidad, especialmente preocupante en aquellos pacientes que no responden a la terapia, viendo disminuida su calidad de vida de manera considerable^{1,152}.

En cuanto a los efectos adversos observados, la quimioterapia puede causar náuseas y vómitos, inmunosupresión, mielosupresión, nefrotoxicidad, neurotoxicidad y ototoxicidad^{152,153}. En cuanto a la radioterapia, la mucositis es el efecto secundario más frecuente, estando presente en aproximadamente la mitad de los pacientes. También puede causar disfagia, ageusia, disfonía, incremento en las secreciones, dermatitis y más a largo plazo, osteorradionecrosis, caries dental, fibrosis subcutánea, trismus, disfunción tiroidea, hipoacusia, estenosis faríngea o esofágica, mielitis y xerostomía^{152,154,155}. El cetuximab presenta menos toxicidad que la quimioterapia, causando principalmente toxicidad dérmica^{89,156}. En el caso de los inhibidores del *checkpoint* inmune, se ha descrito que los efectos secundarios principales son dermatológicos, endocrinos y gastrointestinales¹⁵⁷. Hay que tener en cuenta el incremento importante de la toxicidad que deriva del uso de tratamientos concomitantes¹⁵⁸.

Con el fin de reducir la toxicidad, desde que se estableció la consideración del CECC asociado a VPH como una entidad independiente, se han llevado a cabo ensayos clínicos para desescalar o desintensificar el tratamiento estándar, aunque los resultados obtenidos hasta el momento no son lo suficientemente positivos como para su implantación rutinaria^{134–136}.

Desarrollar estrategias para disminuir la toxicidad de los estándares terapéuticos en CECC continúa siendo un objetivo importante. En esta línea, sería muy interesante la identificación de biomarcadores con relevancia clínica que permitan discernir entre los distintos subgrupos de pacientes que se observan en función de la respuesta al tratamiento para poder llevar a cabo una medicina de precisión, minimizando la toxicidad y optimizando el resultado terapéutico⁸⁹.

2.2. Quimiorresistencia en carcinoma escamoso de cabeza y cuello

La quimiorresistencia es uno de los grandes problemas en el manejo del CECC, ya que muchas estrategias terapéuticas incluyen agentes quimioterapéuticos, teniendo

estos fármacos especial relevancia en el manejo del CECC localmente avanzado irresecable, donde las opciones de tratamiento electivas son la QRTC y la QTI (régimen TPF) seguida de QRTC o radioterapia. La combinación de quimioterapia y radioterapia ha demostrado ser una estrategia terapéutica prometedora, controlando el crecimiento tumoral y mejorando las tasas de supervivencia especialmente en estadios clínicos III, IVa y IVb. La combinación de cisplatino, 5-FU y taxanos, como el docetaxel o el paclitaxel, ha permitido aumentar las tasas de respuesta completa y mejorar, consecuentemente, el pronóstico, convirtiéndose en un estándar terapéutico del CECC localmente avanzado y ofreciendo buenos resultados en algunos casos de enfermedad recurrente o metastásica^{130,132,139,159,160}.

Sin embargo, el panorama global continúa sin ser óptimo. El número de muertes asociadas al CECC está aumentando. Esto se debe, principalmente, a que a pesar de los avances terapéuticos de los últimos años continúa habiendo pacientes que no se benefician de las estrategias terapéuticas actuales. La resistencia a la quimioterapia lleva al fallo terapéutico y a un mal pronóstico. Por este motivo, comprender los mecanismos moleculares responsables de la quimiorresistencia es esencial para mejorar el pronóstico del CECC. Actualmente, se conocen muchas vías de señalización celulares implicadas en este complejo proceso, pero es necesario establecer qué alteraciones son esenciales para la resistencia a distintos fármacos quimioterápicos para poder determinar su potencial como biomarcadores y poder explorar alternativas terapéuticas^{130,161}.

2.2.1. Mecanismos de quimiorresistencia

Se han descrito cuatro mecanismos moleculares principales involucrados en la resistencia a distintos agentes citotóxicos en CECC, incluyendo cisplatino, 5-FU y taxanos (**Figura 14**). Estos mecanismos son:

2.2.1.1. Reparación del daño en el DNA y el RNA

El daño a los ácidos nucleicos se repara a través de cuatro mecanismos principales, incluyendo la reparación de roturas de doble cadena (DSBR) mediante recombinación homóloga o la recombinación no homóloga, la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la reparación de bases mal emparejadas (MMR). La activación de alguno de estos mecanismos de reparación puede constituir una de las estrategias de las células tumorales para tolerar el daño al DNA inducido por los agentes citotóxicos¹³⁰.

Uno de los principales mecanismos de resistencia a cisplatino es la activación de la vía de NER. Hay diversos estudios que demuestran que una expresión elevada de la proteína EERC1, que participa en la reparación del DNA vía NER, se asocia a resistencia a cisplatino en CECC^{162,163}.

En el caso del 5-FU, la reparación del daño al DNA y al RNA mediante MMR y BER parece estar involucrada en la resistencia al tratamiento. Los metabolitos activos derivados del 5-FU pueden incorporarse a los ácidos nucleicos de manera errónea y esto puede ser reparado por la uracil-DNA-glicosilasa (UDG), que participa en la vía de BER¹⁶⁴.

Por último, la activación de mecanismos de reparación del daño en el DNA y el RNA parece tener una menor implicación en la resistencia a taxanos¹³⁰.

2.2.1.2. Expulsión de fármacos

El eflujo de fármacos permite a las células tumorales resistir a agentes citotóxicos al reducir los niveles intracelulares del fármaco. Los transportadores dependientes de ATP o transportadores ABC son un grupo de proteínas transportadoras de membrana que necesitan ATP para su correcto funcionamiento. Algunas de estas proteínas funcionan como bombas de eflujo que pueden expulsar distintos fármacos antineoplásicos, estando asociadas a resistencia a múltiples drogas o *multidrug resistance* (MDR), como MDR1 (también conocida como P-glicoproteína o P-gp), MRP1, MRP2, MRP3 y MRP5¹⁶⁵. Además, existen otros transportadores con un papel importante en quimiorresistencia como las ATPasas transportadoras de cobre, estando entre ellas CTR1, ATP7A y ATP7B^{166,167}. Es preciso tener en consideración que no todas las bombas de eflujo son capaces de expulsar todos los fármacos y que hay fármacos que pueden ser transportados por distintas bombas.

Este mecanismo juega un papel crítico en la resistencia a los taxanos. Asimismo, la alteración del metabolismo celular también está implicada en quimiorresistencia, ya que estas bombas de eflujo precisan grandes cantidades de ATP para poder llevar a cabo su función. Se conoce que las células resistentes a docetaxel y paclitaxel sobreexpresan proteínas transportadoras como MDR1 y MRP5, que evitan que las células tumorales estén expuestas a la citotoxicidad inducida por estos fármacos¹⁶⁸. También se ha demostrado que tanto el paclitaxel como el docetaxel son sustratos de MDR1¹⁶⁹. Recientemente se ha descrito que el eje FOXM1 y MRP1/MRP5 podría ser un nuevo mecanismo de eflujo de fármacos en CECC. Es necesaria la realización de más estudios que permitan descifrar en detalle este proceso molecular, pero lo descrito hasta el momento en células madre de glioma parece indicar que FOXM1 podría promover la

expresión de estas bombas de eflujo a través de la vía de señalización Wnt/ β -catenina¹⁷⁰. Esto es interesante, ya que la activación de la vía Wnt/ β -catenina se ha asociado a quimiorresistencia en CECC¹⁷¹.

2.2.1.3. Inhibición de la apoptosis

Los fármacos antineoplásicos conducen a la apoptosis de las células tumorales mediante distintos mecanismos. La capacidad de estas células para inhibir este proceso puede llevar al fracaso terapéutico debido a la adquisición de resistencia. Se ha descrito que las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) pueden evitar la activación de la vía de señalización apoptótica mediante el bloqueo de las caspasas^{172,173}.

Este mecanismo parece estar implicado en la resistencia a cisplatino, 5-FU y taxanos y se ha asociado con mal pronóstico y menor supervivencia de los pacientes de CECC¹³⁰. En el caso del cisplatino, algunas proteínas anti-apoptóticas que parecen tener un papel relevante en este proceso son cIAP1, XIAP y BIRC6^{174–177}. En la resistencia al 5-FU la sobreexpresión de cIAP2 parece tener un efecto importante¹⁷⁸. En el caso del paclitaxel, se ha demostrado que RSF1 puede inhibir la apoptosis celular promoviendo la señalización mediada por NF κ B, que lleva a la expresión de la survivina, una proteína que puede inhibir la actividad de la caspasa-9, bloqueando la apoptosis^{179–182}.

2.2.1.4. Activación de la señalización de EGFR, FAK y NF κ B

La señalización mediada por EGFR/FAK/NF κ B parece tener un papel relevante tanto en la progresión tumoral como en quimiorresistencia. Se ha descrito que la cinasa de adhesión focal, FAK, puede inducir el eflujo de fármacos mediado por MDR1 a través de la señalización vía SRC/ERK/ETS-1/ β -catenina, promover la proliferación celular induciendo la señalización vía PI3K/Akt/mTOR/NF κ B e inhibir la apoptosis mediada por p53 de manera directa^{183–186}.

Por otra parte, la señalización de EGFR también puede inducir la expresión de bombas de eflujo y promover la proliferación celular activando las mismas vías de señalización que FAK. Estos mecanismos se han descrito principalmente en la resistencia al cisplatino^{130,187}.

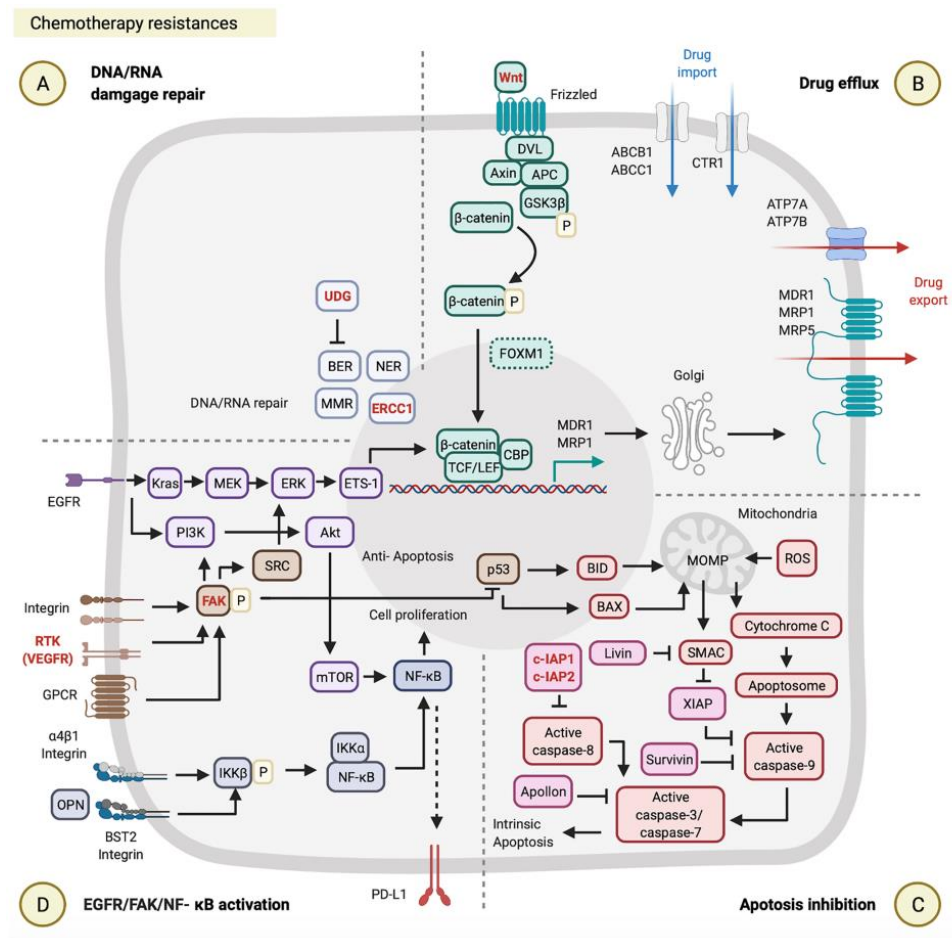


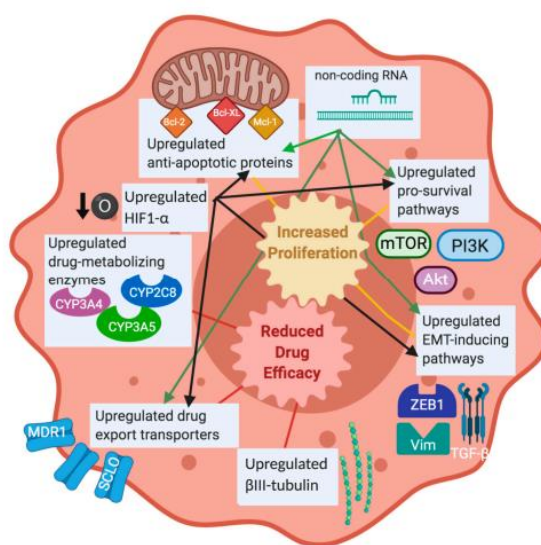
Figura 14. Mecanismos de quimiorresistencia. A) Reparación del daño al DNA y al RNA; B) Expulsión de fármacos; C) Inhibición de la apoptosis; D) Señalización de EGFR/FAK/NFκB. Obtenido de Kanno *et al.*, 2021¹³⁰.

De este modo, hay cuatro mecanismos principales de quimiorresistencia descritos en CECC, que están interrelacionados entre sí, presentando diferencias importantes en la respuesta a cisplatino, 5-FU y taxanos¹³⁰. Además, hay otras muchas alteraciones moleculares que han sido asociadas a fallo terapéutico, que también pueden jugar un papel importante. Procesos celulares importantes, como la autofagia, el metabolismo de fármacos o la regulación epigenética también parecen estar involucrados¹⁸⁸. Asimismo, varios de los mecanismos descritos pueden darse simultáneamente, derivando en resistencia cruzada a varios fármacos que, en principio, están asociados con distintas vías de resistencia¹³⁰. Entre todas estas alteraciones, es necesario determinar los eventos esenciales para que las células tumorales sobrevivan al tratamiento, así como evaluar su potencial como biomarcadores de respuesta.

2.2.2. Resistencia a taxanos

Además de los mecanismos de quimiorresistencia generales mencionados previamente, se han descrito otras alteraciones que podrían ser consideradas como

potenciales biomarcadores de respuesta a taxanos, ya que hay evidencia de su implicación en la resistencia a este tratamiento. Los taxanos se han usado para tratar una gran variedad de tumores, destacando los de origen epitelial, y continúan siendo la primera línea de tratamiento para algunos tipos de cáncer. Sin embargo, muchos pacientes presentan o adquieren tras la exposición repetida a los taxanos, resistencia a esta terapia. Se conoce que esta resistencia es multifactorial y las alteraciones diferenciales entre estos tumores y los tumores sensibles a taxanos son muy numerosas.



Dado que los taxanos se unen a la subunidad β de los microtúbulos y ejercen su principal efecto inhibiendo la despolimerización de los mismos, es coherente que alteraciones que afecten a los microtúbulos estén implicadas en el desarrollo de resistencia a este tratamiento. De este modo, los cambios en el ensamblaje de los microtúbulos pueden llevar a una unión incorrecta del taxanos a distintos isotipos de la β -tubulina. Se ha descrito que un aumento en los niveles del isotipo β III-tubulina, codificada por el gen *TUBB3*, causa resistencia a paclitaxel, haciendo que los

microtúbulos sean menos sensibles a sus efectos¹⁸⁹. Estudios realizados con muestras de CECC, han demostrado que la proteína TUBB3 se encuentra sobreexpresada en la mayor parte de los casos (90%) pero no se correlaciona con la respuesta terapéutica o el pronóstico. Por este motivo, es necesario profundizar más en el papel de esta alteración¹⁹⁰.

Por otra parte, el DNA mitocondrial podría tener un papel relevante en la resistencia a docetaxel inhibiendo la generación de ROS en la cadena respiratoria mitocondrial. Sin embargo, el mecanismo por el que esto ocurre no está claro¹⁹¹.

Además, se conoce que la alteración de enzimas de la superfamilia del citocromo P450, capaces de metabolizar y degradar los taxanos, tiene una correlación con la quimiorresistencia, posiblemente debido a la limitación de la concentración intracelular de fármaco. Estas enzimas se expresan tanto en el tejido sano como en el tumoral, pero su sobreexpresión podría determinar la ineficacia del tratamiento. Se conoce que el docetaxel es metabolizado principalmente por CYP35A y el paclitaxel por CYP3A4, aunque ambos agentes pueden ser metabolizados por CYP3A4^{169,192}.

La hipoxia, que puede inducir señalización relacionada con la supervivencia, la proliferación, la indiferenciación y la autofagia, también puede contribuir a la resistencia a taxanos¹⁹³. El factor de transcripción HIF1- α , es clave en este proceso, ayudando a reducir la eficacia del efecto de los taxanos sobre el ciclo celular y la apoptosis. Esto es posible a través de la activación de distintas vías de señalización, como la de TGF- β , la inducción de la transición epitelio-mesénquima y la inhibición de factores pro-apoptóticos, mecanismos que permiten que las células sobrevivan con bajos niveles de oxígeno y que interfieren en el efecto de los taxanos. A pesar de esto, no parece que la hipoxia sea el mecanismo principal de resistencia a taxanos, pero sí que puede regular muchas vías de señalización y procesos celulares que se conoce que están implicados^{194,195}.

Finalmente, los RNA no codificantes han sido asociados con la activación o inhibición de vías de señalización clave que participan en supervivencia y apoptosis, de tal modo que podrían ser responsables también de la resistencia a taxanos¹⁹³.

Es preciso tener en cuenta que muchos de estos mecanismos de resistencia han sido descritos y caracterizados solo en algunos tipos de cáncer y el CECC no ha sido muy estudiado. Es posible que no todos ellos sean tan relevantes en CECC y que pueda haber otros mecanismos implicados en este tipo concreto de cáncer, por lo que es necesaria la realización de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* específicos para CECC. Lo que parece estar claro es que las bombas de expulsión de fármacos, como MDR1,

tienen un papel muy relevante en resistencia a taxanos en cáncer de manera general^{130,169}. En el caso del CECC, se ha descrito que un aumento de la expresión de Notch1 conlleva a un aumento de la resistencia a paclitaxel y docetaxel, por lo que es otra alteración que podría ser clave¹⁹⁶.

2.2.3. El papel de las vesículas extracelulares en quimiorresistencia

Las vesículas extracelulares (EVs) son pequeñas partículas secretadas por una gran diversidad de tipos celulares al espacio extracelular. Están rodeadas por una bicapa lipídica, que protege de la degradación a las moléculas que contienen, y no tienen la capacidad de replicarse. Pueden contener distintos tipos de moléculas, como proteínas, lípidos, DNA y RNA. Se conoce que median la comunicación intercelular tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La clasificación más habitual es en función de su biogénesis, de tal modo que las EVs se pueden dividir en tres subpoblaciones: exosomas (30-120 nm de diámetro), microvesículas (100-1000 nm) y cuerpos apoptóticos (800-5000 nm). Sin embargo, en investigación, cuando se trabaja con EVs es complicado confirmar su proceso de biogénesis y la *International Society for Extracellular Vesicles* (ISEV) recomienda referirse a ellas por sus características físicas, su composición bioquímica o la descripción de la célula de origen en estos casos^{197,198}.

Las EVs liberadas por células tumorales tienen la capacidad de educar a las células receptoras hacia un fenotipo tumoral, estando implicadas en distintos pasos del desarrollo y de la progresión tumoral e interviniendo en distintos *hallmarks* del cáncer (**Figura 16**). El microambiente tumoral puede verse alterado por las EVs para contribuir al crecimiento y a la supervivencia del tumor, a la angiogénesis tumoral, a la invasión y a la metástasis, a la resistencia a la muerte celular, a la evasión del sistema inmune, a la reprogramación del metabolismo celular y a la resistencia a fármacos. También están involucradas en el desarrollo de metástasis a distancia.

Debido a todo esto, se ha propuesto que la biopsia líquida basada en EVs podría tener un potencial uso clínico para el diagnóstico precoz, la monitorización de la enfermedad y la respuesta terapéutica, el establecimiento del pronóstico y la detección de biomarcadores. Se trata de una técnica muy prometedora, pero que requiere mayor estandarización para su implantación clínica^{197,199–201}.

comunicación intercelular, confiriendo la adquisición de resistencia a células tumorales receptoras sensibles al tratamiento^{197,202–206}.

El papel de las EVs en quimiorresistencia se ha investigado en distintos tipos de cáncer, aunque no hay demasiados estudios en CECC. Estudios llevados a cabo en líneas celulares concluyen que las células resistentes liberan más EVs que las sensibles²⁰⁷. Además, las EVs enriquecidas en miRNA-196a y miRNA-21 parecen mediar la resistencia a cisplatino en CECC de cavidad oral mediante su unión a PTEN/PDCD4 y CDKN1B/ING5, respectivamente^{208,209}. Además, también las EVs también parecen tener un papel importante en la resistencia frente a otros tratamientos, como las terapias dirigidas frente a EGFR o la radioterapia²¹⁰.

De este modo, los hallazgos realizados hasta el momento sugieren que las EVs tienen una función relevante en la resistencia terapéutica en CECC y que deben ser consideradas como potenciales biomarcadores o estrategias terapéuticas²¹⁰.

3. El proceso de autofagia celular

La autofagia es un proceso catabólico de degradación lisosomal de proteínas y orgánulos citoplasmáticos dañados. En este proceso tienen especial importancia los genes relacionados con la autofagia (ATG), aunque también participan otras moléculas. Dependiendo del tipo de transporte de los componentes intracelulares al lisosoma se pueden distinguir tres subtipos principales de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La macroautofagia, habitualmente denominada autofagia, es la vía de degradación lisosomal principal y se caracteriza por la formación de una estructura con doble membrana llamada fagóforo, dando lugar al autofagosoma, que actúa como intermediario en el transporte de los componentes citosólicos al lisosoma. La fusión del autofagosoma con el lisosoma da lugar al autolisosoma, donde las enzimas hidrolíticas degradan los componentes celulares que se hayan internalizado gracias a la acidez de este ambiente. Por otra parte, en la microautofagia, los componentes citosólicos se incorporan al lisosoma a través de invaginaciones en su membrana. Por último, en la autofagia mediada por chaperonas se produce la degradación selectiva de proteínas, que acceden al lisosoma por translocación en un complejo de membrana formado por proteínas chaperonas, que reconocen estas proteínas^{211–213}.

La autofagia es un proceso dinámico que mantiene la homeostasis y la viabilidad celular, con mucha relevancia tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Es

especialmente importante en la respuesta al estrés, la hipoxia, la falta de nutrientes o la acumulación de ROS. En concreto, la macroautofagia juega un papel relevante en cáncer, habiendo sido descrito un efecto dual en el desarrollo y en la progresión tumoral y también en la resistencia terapéutica^{188,214}.

3.1. Bases moleculares de la autofagia

Se han descrito aproximadamente 30 genes *ATG* que participan en el complejo proceso de macroautofagia celular (que será referido como autofagia), en el que hay numerosas vías de señalización implicadas. Se pueden distinguir al menos cuatro fases principales en este proceso autodegradativo: activación de la autofagia y elongación del fagóforo, maduración del autofagosoma, fusión con el lisosoma para dar lugar al autolisosoma y, finalmente, degradación y reciclaje (**Figura 17**)²¹².

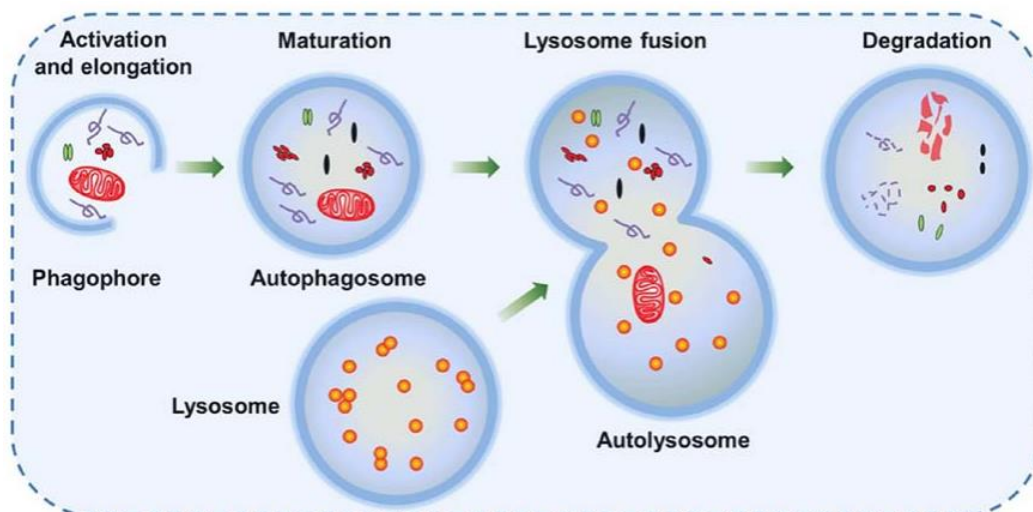


Figura 17. Fases del proceso de autofagia. Obtenido de Li F. *et al.*, 2019²¹².

La formación del fagóforo (doble membrana que al ensamblarse dará lugar al autofagosoma) es el primer paso tras la inducción de la autofagia. El origen de estas membranas no está claro, pudiendo derivar del retículo endoplasmático o de otras estructuras membranosas o formarse *de novo* a partir de lípidos que se encuentren en el citosol, teniendo un papel importante la proteína ATG9, actuando como reservorio. A nivel molecular, ante condiciones de estrés o como consecuencia de la regulación mediada por distintas vías de señalización, la inhibición del complejo mTORC1 lleva a su disociación del complejo ULK1, formado por las proteínas ULK1 (ATG1), ATG13 y FIP200 (ATG17). La activación consecuente del complejo ULK1, que implica la fragmentación del mismo en sus componentes desfosforilados, junto con la activación del complejo PI3K, conduce a la formación del fagóforo completando la inducción de la

autofagia. De este modo, el complejo mTORC1, inhibidor del complejo ULK1 en condiciones basales, desempeña un papel fundamental en la regulación de la autofagia. En cuanto al complejo PI3K, está formado por la proteína PI3K-III, que tiene una función muy importante en la nucleación membranosa, BECLIN1, Vps34, p150 y ATG14. Uno de los reguladores más importantes de este complejo, a través de su interacción con BECLIN1, es la proteína anti-apoptótica Bcl2, que en condiciones basales secuestra BECLIN1, inhibiendo el complejo PI3K, pero en condiciones de estrés, se disocia llevando a la inducción de la vía. Esto permite la interacción de BECLIN1 con Vps34, promoviendo su actividad catalítica y aumentando los niveles de fosfatidilinositol 3-fosfato, necesario para el crecimiento de la membrana (**Figura 18**)^{188,212,213,215}.

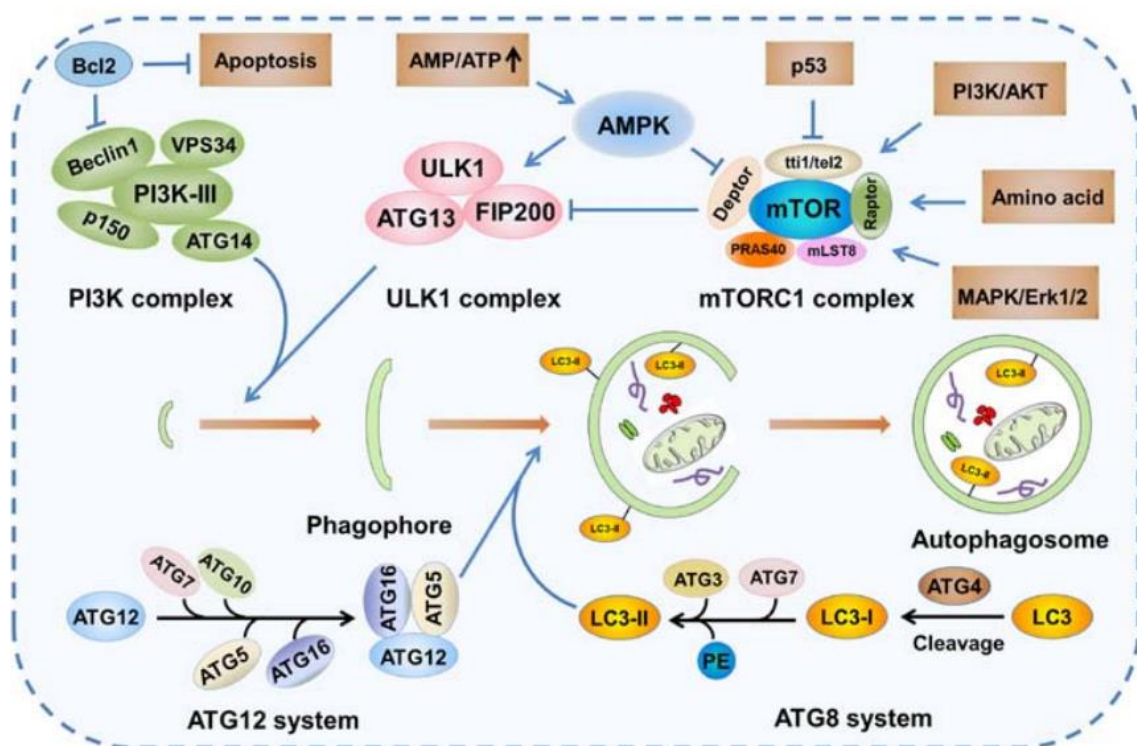


Figura 18. Principales vías de señalización que intervienen en el proceso de la autofagia. Obtenido de Li F. *et al.*, 2019²¹².

Posteriormente, la elongación y la maduración del fagóforo depende de dos sistemas de conjugación similares a la ubiquitina, los sistemas ATG12 y ATG8, en los que están involucradas muchas proteínas autofágicas²¹².

Por un lado, el sistema de conjugación ATG12 permite la conjugación de ATG5 y ATG12, así como su interacción con ATG16L1 y la multimerización en el fagóforo. La proteína ATG7 actúa como una enzima ubiquitina E1, que activa ATG12 de forma dependiente de ATP, uniéndose a su residuo de glicina carboxiterminal. Entonces, ATG12 se transfiere a ATG10, que actúa como una enzima ubiquitina E2, que potencia

la unión covalente de ATG12 a la lisina 130 de ATG5. El complejo conjugado ATG12-ATG5 se empareja con dímeros de ATG16L1, formando un complejo multimérico ATG12-ATG5-ATG16L1, que se asocia al fagóforo en extensión. Una vez que se forma el autofagosoma, el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 se disocia de la membrana^{188,212,213,215,216}.

Por otra parte, el otro sistema de conjugación implicado en la formación del autofagosoma se encarga del procesamiento de la proteína LC3B (ATG8). Cuando se induce la autofagia esta proteína es procesada por la cisteína proteasa ATG4, dando lugar a LC3B-I. Entonces, actúa la proteína ATG7, activando LC3B-I y transfiriéndolo a ATG3, que es otra proteína que actúa como ubiquitina E2, causando su conjugación con fosfatidiletanolamina, dando lugar a LC3B-II. De este modo, la proteína ATG7 tiene un papel fundamental en los dos sistemas de conjugación implicados en la elongación y maduración del fagóforo. A continuación, LC3B-II se recluta y se incorpora al fagóforo en expansión, de manera dependiente a ATG5-ATG12-ATG16L1. LC3B-II se encuentra tanto en la superficie interna como externa del fagosoma y tiene un papel crucial tanto en la fusión de membranas como en la selección de la carga a degradar. El reclutamiento asimétrico de LC3B-II por parte del complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 induce la curvatura del fagóforo. Todo este proceso se describe en la **Figura 18**^{188,212,213,215-217}.

En general, la autofagia se considera un proceso con un componente importante de aleatoriedad, ya que parece que degrada componentes citosólicos de manera indiscriminada. Sin embargo, cada vez existe una mayor evidencia de que la membrana del fagóforo puede interactuar de manera selectiva con agregados proteicos y orgánulos. En este proceso podría tener importancia LC3B-II, actuando como receptor capaz de promover un marcaje selectivo del contenido a degradar. La proteína más descrita con esta función es p62, codificada por el gen SQSTM1, una molécula adaptadora multifuncional que promueve el recambio de agregados proteicos poliubiquitinados y que interacciona con LC3B, degradándose con ellos. Tanto la conversión de LC3B-I a LC3B-II como la acumulación de p62 son considerados marcadores del proceso de autofagia.²¹⁷⁻²²¹

Una vez que se ha formado el autofagosoma tiene lugar un proceso de maduración, previo a la fusión de este con el lisosoma, durante el que el autofagosoma se fusiona con los endosomas tempranos y tardíos, aunque este paso no está muy bien definido²¹³. Cuando se completa esta maduración, durante la fusión con el lisosoma, la proteína LC3B-II localizada en la membrana exterior es escindida por ATG4 y devuelta al citosol,

mientras que la localizada en la membrana interna es degradada por proteasas lisosomales junto con la carga del autofagosoma²¹⁵. Finalmente, se forma el autolisosoma, un proceso en el que tiene mucha importancia el citoesqueleto. Además, las catepsinas B y D son necesarias para el reciclaje del autofagosoma y la maduración del autolisosoma. LAMP-1 y LAMP-2 son otras dos proteínas lisosomales fundamentales para que se complete el proceso de autofagia. Las moléculas resultantes de la degradación (aminoácidos, ácidos grasos y nucleótidos) son transportadas al citosol para participar en rutas de biosíntesis y mantener las funciones celulares en condiciones de estrés celular^{213,215}.

De este modo, la autofagia es un proceso crucial para la supervivencia celular que se activa en respuesta a distintos estímulos e interacciona con numerosas vías de señalización. Se ha descrito también un proceso de autofagia alternativo, independiente de ATG7 y ATG5, que podría tener relevancia tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, pero tanto los mecanismos moleculares implicados como las funciones de este proceso están comenzando a ser estudiados y no se conocen en profundidad^{222,223}.

Por otra parte, se conoce que las proteínas ATG tienen más funciones, independientes de la autofagia, que también pueden tener relevancia en el papel de su alteración en cáncer. En concreto, se ha descrito que ATG7 regula el ciclo celular a través de su unión a p53^{214,224}.

3.2. El papel de la autofagia en cáncer

La autofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis celular, que requiere de la existencia de un balance entre los procesos anabólicos y catabólicos. Su alteración ha sido asociada con distintas enfermedades, entre las que se encuentra el cáncer^{216,225,226}.

La autofagia desempeña un papel dual en cáncer, pudiendo contribuir tanto a la supresión como a la progresión tumoral. Tanto la inhibición de la autofagia como la inducción de este proceso se han asociado al desarrollo del cáncer. En términos generales, parece que la autofagia inhibe la iniciación tumoral, pero contribuye al mantenimiento del tumor cuando este está establecido promoviendo el crecimiento celular descontrolado y aumentando la actividad metabólica. Asimismo, en estadios muy avanzados, la inhibición de la autofagia puede tener un efecto protumoral. En términos generales, la autofagia es un proceso vital para el correcto funcionamiento de las células y cualquier descontrol del mismo puede tener un efecto en el desarrollo tumoral.

Además, los efectos de la autofagia dependen del estadio tumoral, del tejido, de las mutaciones oncogénicas y del contexto celular. Por este motivo, la autofagia es un proceso que continúa investigación, con el fin de establecer tanto su contribución a la patogénesis tumoral como su potencial como estrategia terapéutica^{214,227}.

3.2.1. La autofagia en la supresión tumoral

En células sanas, la autofagia promueve la supervivencia celular, siendo un mecanismo de adaptación metabólica ante la falta de nutrientes y contribuyendo a la integridad celular, a la estabilidad genómica, al mantenimiento del balance redox y a la proteostasis. Por este motivo, no es sorprendente que este proceso tenga un papel en la supresión tumoral. Ante el estrés oncogénico, la autofagia puede tener una función protectora para la célula²¹¹.

El primer hallazgo relacionado con el papel supresor tumoral de la autofagia fue la alteración del gen *BECN1*, que codifica la proteína BECLIN1, que forma parte del complejo PI3K necesario para la formación del fagóforo, en tejido tumoral²²⁸⁻²³¹. Posteriormente, se describió la alteración de otros muchos genes que participan en la autofagia en la tumorigénesis temprana. Sin embargo, la realización de estudios funcionales permitió determinar que las consecuencias de estas alteraciones dependen del tejido donde se produzcan y son específicas para cada uno de los genes implicados en la autofagia^{214,232}. Por ejemplo, la delección de *ATG7*, sin estar acompañada por otras alteraciones genéticas, conduce a la formación de tumores solo en el hígado²³³. En otros tejidos, puede alterar el fenotipo y contribuir al desarrollo tumoral, pero se ha demostrado que se necesitan otras alteraciones genéticas para la iniciación del tumor²¹⁴. Esto confirma que la relación entre la autofagia y el desarrollo del cáncer es compleja.

A pesar de la complejidad de este proceso, hay cada vez más evidencia del papel supresor de la autofagia. Hay que tener en cuenta que el proceso de autofagia está regulado por vías de señalización supresoras de tumores. En concreto, p53 tiene un papel importante en la modulación de la autofagia. Existe cierta reciprocidad en la relación entre p53 y la autofagia, ya que proteínas como *ATG7* pueden a su vez interactuar con p53 y regular algunas de sus funciones^{214,216,234}. Por otra parte, se ha descrito que un defecto en la autofagia se puede asociar con un mayor daño al DNA, lo que también puede contribuir a la tumorigénesis^{235,236}. Asimismo, la autofagia es un mecanismo efector de la senescencia, constituyendo un mecanismo alternativo de supresión tumoral. La inhibición de la autofagia favorece que las células con alteraciones oncogénicas no entren en senescencia y proliferen, permitiendo el desarrollo tumoral^{237,238}.

Se han identificado mutaciones inactivantes y deleciones, así como una disminución de la expresión, de numerosos genes importantes en el proceso de autofagia en distintos tipos de cáncer. De este modo, aunque no estén bien descritos los mecanismos que subyacen al vínculo entre la autofagia y la supresión tumoral, la existencia de una asociación parece estar clara^{214,232}.

3.2.2. La autofagia en la progresión tumoral

El papel de la autofagia en el mantenimiento de los tumores ya establecidos y en la progresión de los mismos comenzó a estudiarse tras la identificación de altos niveles de la isoforma activada de LC3B (LC3B-II) en el tejido tumoral, que sugerían una acumulación de autofagosomas. A pesar de que es complicado analizar la señalización autofágica en los tumores, más allá del estudio de determinadas proteínas o marcadores, desde entonces ha aumentado la evidencia de que la autofagia puede contribuir al crecimiento y al metabolismo de tumores en estadios avanzados^{214,239}.

Se ha demostrado que la autofagia promueve el desarrollo tumoral como consecuencia de una activación oncogénica. La mutación de oncogenes, que actúan como *drivers* en la carcinogénesis, como los genes de la familia *RAS*, promueve la proliferación y supervivencia de las células tumorales, pero esto genera una importante demanda energética. De este modo, la obtención de precursores anabólicos derivada de la autofagia contribuye a solventar la disponibilidad limitada de nutrientes externos, lo que permite el desarrollo del tumor. En algunos casos, esta dependencia de la autofagia puede ser suplida por la inactivación de genes supresores de tumores, aunque depende del tipo de cáncer. Así, las alteraciones responsables de la transformación oncogénica pueden condicionar el papel y la relevancia de la autofagia en la progresión tumoral²⁴⁰⁻²⁴².

Una de las principales diferencias entre las células sanas y las tumorales radica en el metabolismo. Se ha descrito que en muchos tumores aumenta la glicólisis en detrimento de la fosforilación oxidativa mitocondrial, ya que se trata de un proceso mucho más rápido aunque la tasa de generación de ATP es menor. Sin embargo, la función mitocondrial continúa siendo necesaria para ciertas reacciones metabólicas y la autofagia se encarga de preservar la integridad mitocondrial. De este modo, la autofagia contribuye a la progresión tumoral²⁴³. A pesar de ello, esto es un arma de doble filo, ya que la inhibición de la autofagia en este punto puede llevar a alteraciones metabólicas y redox que se ha descrito que pueden aumentar el crecimiento metastásico. Este es otro ejemplo de la complejidad de la autofagia y de su regulación, que confirma que su efecto depende del contexto celular y de las alteraciones moleculares de las células²¹⁴.

3.2.3. El papel dual de la autofagia en la metástasis

El papel de la autofagia en la metástasis, la principal causa de muerte de los pacientes de cáncer, sigue siendo controvertido. Por un lado, se ha descrito que la autofagia promueve la activación de vías de señalización cruciales para el desarrollo de metástasis, como la migración y la invasión, la transición epitelio-mesénquima, la supervivencia y la adaptación a situaciones de estrés como la hipoxia o la privación de nutrientes^{214,244}.

Por otra parte, estudios más recientes han demostrado que la autofagia restringe pasos clave en la cascada metastásica. Muchos tipos de cáncer, como el melanoma y distintos carcinomas, diseminan células tumorales que permanecen latentes y clínicamente indetectables en el órgano metastásico durante largos periodos de tiempo, hasta que experimentan un aumento de proliferación y dan lugar a una metástasis activa. Se ha descrito que la autofagia es clave en el control de la salida de este estado latente y en la supresión de la colonización del nicho metastásico, aunque no se conozcan los mecanismos exactos a través de los cuales esto sucede. Diversos estudios preclínicos han demostrado que la inhibición de la autofagia, mediante la inactivación de proteínas clave, causa una salida del estado latente y la proliferación de las células metastásicas, dando lugar a un aumento de la agresividad del cáncer²⁴⁴⁻²⁴⁷.

Además, se han llevado a cabo diversos estudios sobre la acumulación de p62 en el tejido tumoral, que refleja una inhibición de la autofagia, que coinciden en que este evento promueve la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia terapéutica, a través de la mediación de distintas vías de señalización, como la de NFkB^{248,249}. De este modo, aunque parece estar claro que la autofagia tiene un papel supresor tumoral en el inicio del proceso carcinogénico, tanto la inducción como la inhibición de este proceso pueden contribuir a la progresión tumoral y al desarrollo de metástasis en función del contexto tumoral.

3.2.4. La autofagia en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello

El papel de la autofagia en CECC ha sido estudiado principalmente en el cáncer de cavidad oral. En estos tumores se ha relacionado tanto un aumento en los niveles de p62, como una disminución de los niveles de BECLIN1, alteraciones asociadas con una inhibición de la autofagia, con una mayor agresividad tumoral y una menor supervivencia de los pacientes. Sin embargo, paradójicamente, un incremento en la expresión de la isoforma activada de LC3B (LC3B-II) en CECC de cavidad oral también se ha asociado con un peor pronóstico²⁵⁰⁻²⁵³. Esto concuerda con lo observado en otros tipos de cáncer y con el papel dual de la autofagia descrito previamente. Asimismo, hay que tener en

cuenta que la autofagia es un proceso dinámico y que la detección de un marcador en un momento determinado puede no estar reflejando con fidelidad lo que está ocurriendo en las células.

Por otra parte, también se han identificado alteraciones en la autofagia en tumores nasofaríngeos, asociados habitualmente a VEB. En este caso, se ha asociado un aumento de los niveles de expresión de BECLIN1 con una menor supervivencia global, sugiriendo que en este caso la autofagia actúa como un mecanismo de supervivencia tumoral^{250,254}. En el resto de localizaciones del CECC, el número de estudios realizados en este campo es muy limitado.

Además, algunas vías de señalización alteradas de manera muy frecuente en CECC, como la de EGFR o PI3K, regulan la autofagia, de manera directa o a través de otras rutas. Por este motivo, es lógico que este proceso esté involucrado de algún modo en el CECC. Hay que tener en cuenta que el CECC es una entidad altamente heterogénea que incluye múltiples localizaciones y numerosos factores etiológicos, por lo que es lógico que el papel de la autofagia en el desarrollo tumoral del CECC sea variable. De hecho, se ha descrito que la exposición al tabaco y alcohol puede inducir la autofagia celular²²⁷.

Además, ha sido descrito que algunos de los tratamientos empleados de manera habitual en el tratamiento del CECC, como la radiación o los taxanos, inducen la autofagia. En este sentido, es interesante tratar de correlacionar la respuesta a estos tratamientos con las alteraciones de la autofagia encontradas en los tumores, para determinar si estas pueden condicionar de algún modo la respuesta terapéutica. Por otro lado, el uso de moduladores de autofagia es una estrategia de tratamiento muy prometedora, pero es necesaria la realización de más estudios para determinar los subgrupos de pacientes que se podrían beneficiar de esta, bien en solitario bien en regímenes concomitantes con los tratamientos actuales²⁵⁰.

Una de las principales limitaciones del estudio de la autofagia en CECC es que la mayor parte de los diagnósticos se realizan en estadios localmente avanzados, de modo que resulta complicado determinar la sucesión temporal de las alteraciones tumorales⁴. Esto es especialmente importante en el estudio de la autofagia ya que parece estar claro que su efecto en el desarrollo tumoral cambia a lo largo del proceso carcinogénico²⁵⁰.

3.3. El papel de la autofagia en quimiorresistencia

Existe cada vez una mayor evidencia de que la autofagia también está implicada en la resistencia a la quimioterapia. Al igual que en el desarrollo tumoral, la autofagia juega un papel dual en la respuesta terapéutica, pudiendo actuar como mecanismo de supervivencia de las células tumorales expuestas a agentes quimioterapéuticos o promoviendo la muerte celular (**Figura 19**)^{227,255,256}.

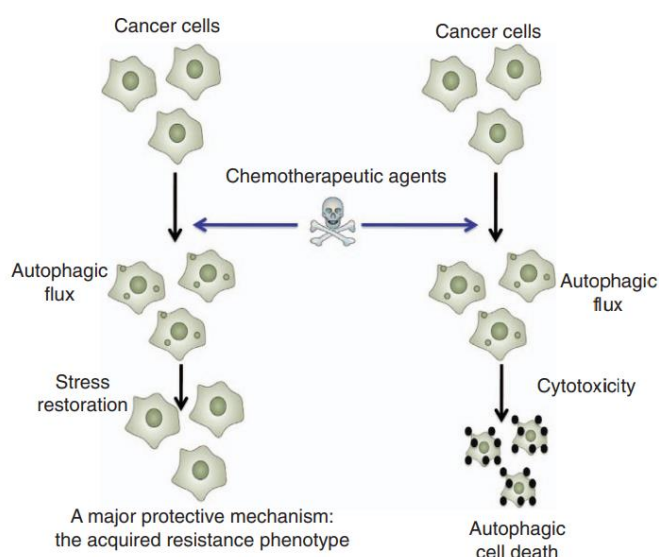


Figura 19. Papel dual de la autofagia en la respuesta a la quimioterapia. Obtenido de Sui X., et al., 2013²⁵⁵.

En el caso de los agentes que causan daño en el DNA, como el cisplatino o el 5-FU, que se emplean habitualmente en la clínica para tratar el CECC, la inducción de la autofagia parece estar implicada en quimiorresistencia. Esto sugiere que la combinación de estos agentes con inhibidores de la autofagia podría ser una aproximación terapéutica efectiva para vencer la resistencia y mejorar el resultado terapéutico^{227,255}.

Por otra parte, los taxanos causan una inducción de la autofagia que, junto con la apoptosis, lleva a la muerte celular. En estos casos, parece que tanto la inhibición como la inducción de la autofagia puede dar lugar a la resistencia al tratamiento. Sin embargo, los estudios realizados hasta el momento no son muy concluyentes y ponen de manifiesto la necesidad de continuar la investigación en este campo. Comprender mejor este proceso es fundamental para que se convierta en una solución clínica²⁵⁷.



HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) es una entidad que agrupa tumores heterogéneos desde un punto de vista tanto clinicopatológico como molecular, con distintas localizaciones y factores etiológicos asociados. En el momento actual, el carcinoma de orofaringe asociado a VPH constituye un subgrupo de CECC que presenta un mecanismo carcinogénico diferencial y un mejor pronóstico.

La mayor parte de los casos de CECC se diagnostican en estadios localmente avanzados y, en los últimos años, se han introducido nuevas estrategias terapéuticas que han supuesto una mejoría en el pronóstico de este tipo de cáncer. Uno de los tratamientos estandarizados en el CECC localmente avanzado es la quimioterapia de inducción con cisplatino, 5-FU y taxanos previa a la administración de radioterapia o quimiorradioterapia concomitante. La combinación de estos tres fármacos ha logrado una mayor tasa de respuesta. Sin embargo, existen subgrupos de pacientes que presentan fallo terapéutico precoz y mal pronóstico. De este modo, la resistencia al tratamiento es un problema de primer orden en el manejo del CECC. Actualmente, no existen biomarcadores que permitan identificar de antemano a estos pacientes, que se exponen a una elevada toxicidad sin lograr ningún beneficio terapéutico.

Por todo ello, es necesario caracterizar los mecanismos moleculares que subyacen al desarrollo de resistencia al tratamiento, para así poder identificar biomarcadores de respuesta con potencial uso clínico y, paralelamente, buscar alternativas terapéuticas efectivas. En este sentido, es preciso profundizar más en el funcionamiento de los mecanismos de resistencia ya establecidos y caracterizar también otros mecanismos menos estudiados que puedan ser igualmente importantes. De este modo, se podrá avanzar hacia una medicina de precisión en CECC.

Teniendo en cuenta todo esto, la hipótesis de este trabajo es que profundizar en la caracterización de las alteraciones moleculares responsables de la resistencia a los taxanos en CECC permitirá identificar biomarcadores de respuesta y alternativas terapéuticas.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

Para abordar la hipótesis del trabajo, se estableció como objetivo principal caracterizar a nivel molecular el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) resistente a taxanos e identificar tanto potenciales biomarcadores como alternativas terapéuticas para esta entidad. En consonancia con esto, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Generar líneas celulares de CECC resistentes a taxanos.
2. Caracterizar el papel de la pérdida de *ATG7* en el proceso de autofagia y en la resistencia a taxanos, empleando una línea celular de CECC editada genéticamente mediante la tecnología CRISPR-Cas9 para inactivar este gen.
3. Identificar alteraciones en el número de copias asociadas al fracaso terapéutico de la quimioterapia de inducción en una cohorte representativa de la población española de pacientes diagnosticados con CECC localmente avanzado, incluidos en un ensayo clínico y tratados de manera homogénea.
4. Caracterizar los mecanismos moleculares responsables de la resistencia a taxanos e identificar alteraciones candidatas a constituir biomarcadores de respuesta en líneas celulares de CECC resistentes a taxanos.
5. Analizar la capacidad migratoria y proliferativa de las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos.
6. Establecer el papel de las vesículas extracelulares en el desarrollo de resistencia empleando líneas celulares de CECC resistentes a taxanos.
7. Analizar la respuesta a los tratamientos que forman parte de la terapia combinada TPF de las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos, incluyendo cisplatino, 5-fluororacilo y radiación.
8. Analizar el daño en el DNA de las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos tanto a nivel basal como tras el tratamiento con un agente inductor de daño.
9. Identificar alternativas terapéuticas efectivas en líneas celulares de CECC resistente a taxanos.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Pacientes incluidos en el estudio

Se seleccionaron un total de 177 pacientes que formaron parte del ensayo clínico en fase II, aleatorizado, abierto y multicéntrico TTCC-2007-01 (NCT0071639122), coordinado desde el servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Salamanca en el que participaron 20 hospitales españoles, todos ellos pertenecientes al Grupo Español de Tumores de Cabeza y Cuello (TTCC). Todos los pacientes fueron diagnosticados con CECC localmente avanzado e irresecable, correspondiente a los estadios clínicos III, IVa y IVb. Las muestras de tejido tumoral se obtuvieron en el momento del diagnóstico y se conservaron en parafina.

Los pacientes fueron tratados de manera homogénea, recibiendo inicialmente tres ciclos de quimioterapia de inducción con el régimen TPF (docetaxel, cisplatino y 5-FU concomitante) seguido de cisplatino y radioterapia (cis + RT) o cetuximab y radioterapia (cet + RT). En este trabajo se tuvo en cuenta la respuesta al régimen TPF, estableciendo tres subgrupos de respuesta: estabilización de la enfermedad (EE), respuesta completa o parcial (RC/RP) y toxicidad al tratamiento (TOX). Ninguno de los pacientes incluidos en el estudio presentó progresión de la enfermedad.

La información clinicopatológica y de seguimiento fue cumplimentada por los investigadores de cada centro según los criterios incluidos en el ensayo. Todos los datos recogidos para el estudio fueron tratados con las medidas de seguridad establecidas en cumplimiento de la Ley Orgánica 15/1999, del 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y custodiados por el Hospital Universitario de Salamanca. En la **Tabla 2** se recogen las características clinicopatológicas de los 177 pacientes incluidos en este trabajo en función de los subgrupos de respuesta establecidos.

Por otra parte, se realizó un estudio con 15 muestras de tejido tumoral conservado en parafina con diagnóstico de CECC realizado en el Hospital Universitario de Salamanca, pertenecientes a otra serie de pacientes.

Tabla 2. Características clinicopatológicas generales de los pacientes incluidos en el estudio.

Característica	TPF (n=177)	EE (n=34)	CR/CP (n=122)	TOX (n=21)
Sexo, n (%)				
Hombre	160 (90,39)	30 (88,23)	111 (91)	19 (90,5)
Mujer	17 (9,6)	4 (11,76)	11 (9)	2 (9,5)
Edad: mediana (intervalo), años	57 (29-73)	56 (41-70)	58 (41-70)	60 (42-71)
Localización tumoral, n (%)				
Cavidad oral	31 (17,5)	5 (14,71)	22 (18,03)	4 (19,04)
Orofaringe	69 (39,1)	19 (55,88)	45 (36,89)	5 (23,81)
Laringe	30 (16,9)	2 (5,88)	27 (22,13)	1 (4,76)
Hipofaringe	47 (26,5)	8 (23,53)	28 (22,95)	11 (52,39)
Categoría tumoral (T), n (%)				
T1-3	52 (29,38)	7 (20,59)	42 (34,43)	3 (14,29)
T4	124 (70,06)	27 (79,41)	79 (64,75)	18 (85,71)
Desconocida	1 (0,56)	0 (0)	1 (0,82)	0 (0)
Afectación ganglionar (N), n (%)				
N0/1	41 (23,2)	7 (20,59)	29 (23,77)	5 (23,81)
N2	113 (63,8)	19 (55,88)	80 (65,57)	14 (66,67)
N3	22 (12,5)	8 (23,53)	12 (9,84)	2 (9,52)
Desconocida	1 (0,5)	0 (0)	1 (0,82)	0 (0)
Grado, n (%)				
Grado 1	17 (9,61)	3 (8,82)	13 (10,66)	1 (4,76)
Grado 2	61 (34,46)	15 (44,12)	41 (33,6)	5 (23,81)
Grado 3/4	97 (54,8)	16 (47,06)	66 (54,1)	15 (71,43)
Desconocido	2 (1,13)	0 (0)	2 (1,64)	0 (0)
Estadio, n (%)				
III	15 (8,5)	1 (2,94)	12 (9,84)	2 (9,52)
IVa	126 (71,2)	24 (70,59)	87 (71,31)	15 (71,43)
IVb	35 (19,8)	9 (26,47)	22 (18,03)	4 (19,04)
Desconocido	1 (0,5)	0 (0)	1 (0,82)	0 (0)
VPH, n (%)				
Positivo	23 (13)	3 (8,83)	21 (17,21)	0 (0)
Negativo	139 (78,5)	29 (85,29)	90 (73,77)	20 (95,24)
Desconocido	14 (0,5)	2 (5,88)	11 (9,02)	1 (4,76)
No fumador, n (%)	22 (12,43)	7 (20,59)	14 (11,48)	5 (23,81)
No bebedor, n (%)	38 (21,47)	9 (26,47)	23 (18,85)	8 (38,1)

2. Cultivos celulares

2.1. Líneas celulares

Se emplearon tres líneas celulares diferentes derivadas de CECC, cuyas características se detallan en la **Tabla 3**. Dos de ellas fueron establecidas en la Unidad de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca de manera previa al desarrollo de este proyecto a partir de biopsias tumorales de pacientes con CECC localmente avanzado con origen en la orofaringe y la laringe y distinto estatus de infección por VPH. La otra es una línea celular comercial, CAL33, con origen tumoral en la lengua.

Las tres líneas celulares se cultivaron con medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 1X con L-glutamina (Gibco™, Life Technologies) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) inactivado (Gibco™, Life Technologies) y un 1% del cóctel de antibióticos penicilina/estreptomicina (P/S) (Gibco™, Life Technologies). Se mantuvieron en un incubador (Cultek S.L.U.) a 37°C, con un 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa. Todas ellas crecen en monocapa adheridas a las placas de cultivo. Se emplearon placas de distintos tamaños para realizar diferentes ensayos, incluyendo placas de 60 (P60), 100 (P100) y 150 (P150) mm de diámetro, flasks T25, T75 y T175 y placas de 6, 12, 24 y 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Además, se comprobó la ausencia de micoplasma en los cultivos celulares de manera regular empleando el kit comercial *MycoAlert kit* (Lonza), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3. Características de las líneas celulares de CECC empleadas.

Línea celular	Fuente	Tumor de origen	VPH
CAL33	DSMZ: ACC 447	Carcinoma escamoso de lengua	-
32816	Establecida en el laboratorio	Carcinoma escamoso de orofaringe	+
32860	Establecida en el laboratorio	Carcinoma escamoso de laringe	-

Asimismo, se empleó la línea celular no tumoral HEK-293T (#CRL-3216, ATCC®), derivada de tejido embrionario de riñón, que contiene el antígeno T SV40, para la producción de virus y la posterior realización de ensayos funcionales. Esta línea celular se cultivó con medio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Gibco™, Life Technologies) con glucosa (4,5 g/L), L-glutamina y L-piruvato, suplementado con un 10% de FBS inactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina. Se mantuvo en cultivo en las mismas condiciones que las líneas celulares de CECC y en este caso también se testó la presencia de micoplasma de manera regular.

2.2. Congelación, descongelación y mantenimiento

Las líneas celulares se preservaron en tanques de nitrógeno líquido a -196°C, resuspendidas en FBS con un 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) y almacenadas en crioviales. El proceso de descongelación de las mismas es un proceso rápido. Los crioviales se retiraron de los tanques de nitrógeno líquido en hielo seco y se introdujeron en un baño húmedo a 37°C. Tras esta descongelación rápida, se sembró el contenido del criovial gota a gota en placas de cultivo de 10 cm de diámetro con el medio

correspondiente previamente precalentado a 37°C. Se introdujeron en un incubador y 16 horas después, tras la adhesión de las células, se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) 1X Na/K y el cambio de medio por medio fresco, para eliminar los restos de DMSO.

Por otra parte, a lo largo de este trabajo, se congelaron tanto las líneas celulares de origen como las generadas mediante distintos procedimientos. Para ello, se partió de placas de 10 cm de diámetro y se despegaron las células empleando 1 ml del agente de disociación TrypLE Express 1X (Gibco™). Tras una incubación de 5 minutos a 37°C, se recogieron las células con el medio de cultivo correspondiente y se pasaron a un tubo Falcon™ con una capacidad de 15 ml. Se realizó una centrifugación a 800 rpm durante 3 minutos y se retiró el sobrenadante. El botón celular se resuspendió en medio de congelación (FBS con un 10% de DMSO) y se pasó a un criovial. Este se introdujo en el recipiente de congelación Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific), que permite que la congelación se produzca paulatinamente, con una bajada de temperatura de 1°C por minuto, y se guardó en un congelador a -80°C. Tras al menos 4 horas, se retiraron los crioviales del recipiente de congelación y se bajaron a los tanques de nitrógeno líquido para su conservación a -196°C a largo plazo.

Para el mantenimiento de las células en cultivo, se realizaron pases dos veces por semana, cuando las células habían alcanzado una confluencia del 80-90%. Tanto para las líneas celulares de CECC como para la línea celular HEK 293T, se realizaron pases 1:20. De manera general, se intentó evitar trabajar con células que llevaran mucho tiempo en cultivo, ya que esto puede inducir la alteración de las características de la línea celular.

2.3. Contaje de células

Para sembrar las células para los distintos experimentos, previamente se realizó un contaje con cámara de Neubauer, un portaobjetos con dos pequeñas depresiones que tienen una cuadrícula de dimensiones conocidas marcadas. Aquí se añadió una muestra de células resuspendidas en medio de cultivo y diluidas azul de tripán, un colorante que permite determinar la viabilidad celular, ya que las células vivas no se tiñen, al tener la membrana celular intacta, pero las células muertas sí lo hacen. Después, se cubrió la cámara con un cubreobjetos, que se adhirió por tensión superficial. En cada una de las partes de la cámara se pudieron visualizar 4 cuadrantes sobre los que se depositan las células. Se contaron las células de cada cuadrante a través de su observación en un microscopio óptico y se hizo la media aritmética. El factor de dilución de la cámara de

Neubauer es de 1:10000, de tal forma que la media de células por cuadrante se multiplicó por 10000 para determinar así el número de células por ml de muestra. De este modo, se pudo calcular el volumen necesario para sembrar las células requeridas para cada experimento.

3. Generación de líneas celulares resistentes a taxanos

Para establecer líneas celulares de CECC resistentes a taxanos se partió de las líneas celulares CAL33, 32816 y 32860 y se siguió un protocolo descrito previamente, basado en el incremento progresivo de dosis del agente citotóxico²⁵⁸.

En primer lugar, se determinó la respuesta a paclitaxel de las tres líneas celulares a 24, 48 y 72 horas mediante el ensayo de viabilidad celular MTT y se determinó la concentración inhibitoria media (IC50), que se corresponde con la concentración que inhibe la actividad biológica al 50% respecto a un control, para cada tiempo, empleando el software *Graphpad Prism 9.4.1*. Finalmente, se seleccionó la IC50 a 24 horas porque el paclitaxel causaba un efecto importante en la viabilidad celular desde este tiempo.

Las células se sembraron en placas de 10 cm de diámetro para conseguir una confluencia del 20% tras 24 horas, correspondiente con un pase 1:10 a partir de una placa al 80% de confluencia. Las células con una confluencia del 20% se trataron inicialmente con una dosis de paclitaxel correspondiente al 10% de la IC50. Tras 24 horas se cambió el medio de cultivo por medio fresco sin fármaco y comenzó un periodo de recuperación. Cuando las células proliferaron hasta un 80% de confluencia, se realizó un pase para conseguir de nuevo una confluencia del 20% tras 24 horas, y el resto de células se congelaron para poder volver a ese punto en el caso de que las células no se recuperasen tras un ciclo de tratamiento. Entonces, se llevó a cabo un nuevo ciclo de tratamiento, incrementando la dosis en un 10%. Siguiendo este procedimiento se administraron un total de 25 ciclos de tratamiento a lo largo de 3 meses hasta alcanzar una dosis de paclitaxel de 50 nM, que inicialmente causaba una inhibición total de la viabilidad celular. El proceso llevado a cabo se resume en la **Figura 20**.

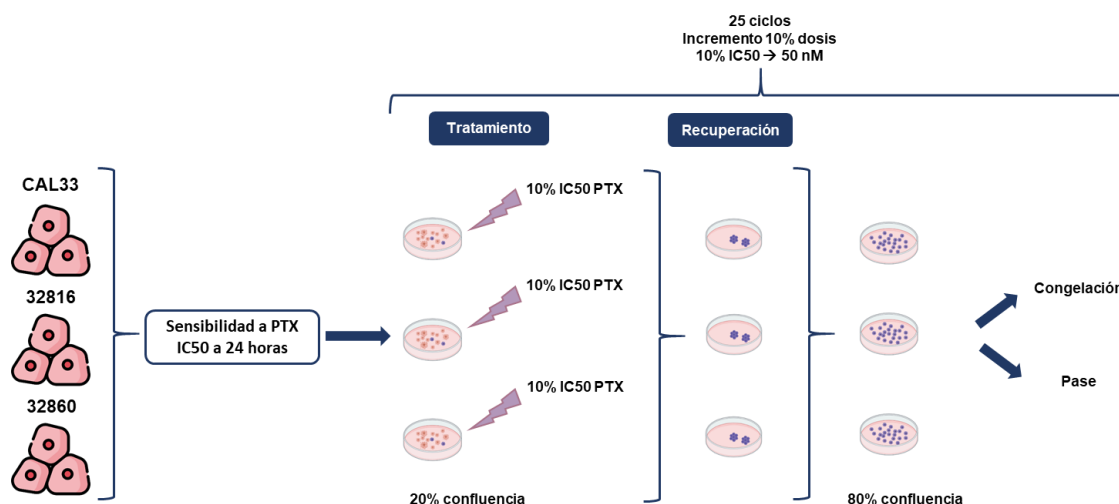


Figura 20. Proceso de generación de líneas celulares de CECC resistentes a paclitaxel. Elaborado con imágenes de www.biorender.com.

Tras la finalización de este proceso se comprobó la adquisición de resistencia tanto a paclitaxel como a docetaxel mediante un ensayo de viabilidad MTT y un ensayo de apoptosis, confirmando de este modo la generación exitosa de dos líneas celulares de CECC resistentes a taxanos, llamadas CAL33-R y 32816-R.

Este proceso de inducción de resistencia a taxanos también se llevó a cabo con tres líneas celulares derivadas de la línea celular 32816 *knockout* para ATG7 y tres líneas celulares transfectadas con un vector vacío como control. Con el objetivo de monitorizar de un modo más preciso el proceso de adquisición de resistencia se contaron las células antes de cada ciclo de tratamiento, sembrando 1 millón de células en cada placa de 10 cm de diámetro para ser tratadas 24 horas después. Además, en estas líneas celulares se realizaron 12 ciclos de tratamiento, partiendo del 10% de la IC_{50} a 24 horas y hasta alcanzar una dosis de 10 nM de paclitaxel.

4. Determinación del cariotipo de las líneas celulares

En este trabajo, se recurrió a la citogenética convencional para determinar el cariotipo de las tres líneas celulares de CECC empleadas, así como de las líneas celulares resistentes a taxanos, CAL33-R y 32816-R, con el objetivo de identificar posibles alteraciones diferenciales respecto a las líneas celulares parentales de las que derivan.

La determinación del cariotipo se realizó mediante bandeo G, un procedimiento que se basa en la tinción Wright-Giemsa de los cromosomas, dando lugar a un patrón de bandas oscuras y claras característicos que permite su identificación. De esta manera,

se pueden detectar aneuploidías (ganancias y/o pérdidas cromosómicas) y aberraciones estructurales.

Se partió de las distintas células en cultivo en placas P100 a un 80% de confluencia (para lo que se hizo un pase 1:5 a partir de una placa confluyente 24 horas antes). A estas células se les añadieron 100 µl de *KaryoMAX® COLCEMID®* a 10 µg/ml (Life Technologies) y se volvieron a introducir en el incubador durante 1 hora y 30 minutos. De este modo, se sincronizaron en metafase. Tras la incubación, se despegaron las células, se resuspendieron en medio, se transfirieron a un tubo de 15 ml y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos.

El botón celular se resuspendió en 1,5 ml de una solución hipotónica compuesta por KCl 20 mM y citrato sódico 10 mM en proporción 1:1 y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 10 gotas de fijador Carnoy (metanol: ácido acético glacial en proporción 1:1) para romper las membranas celulares y fijar los cromosomas. Después, se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se incubaron a 4°C durante 20 minutos. Este paso se repitió al menos 3 veces. Finalmente, se volvió a añadir fijador Carnoy a las células.

Tras la fijación, se procedió a la tinción de los cromosomas. Para ello, se usaron portaobjetos que se introdujeron en una mezcla de etanol: éter en proporción 1:1 y se dejaron secar. Después, se añadieron dos gotas de la suspensión de células que se extendieron sobre el portaobjetos y se introdujeron en una cámara con un 60% de humedad, tras lo cual se incubaron a 60°C durante toda la noche. Al día siguiente, se introdujeron los portaobjetos en una solución de HCl 0,2 N en ddH₂O, se lavaron con ddH₂O a 4°C y se dejaron secar. A continuación, se sumergieron en una solución de SCC 1X a 60°C durante 15 minutos, en una estufa con ambiente húmedo. Finalmente, para realizar una tinción, se preparó una solución compuesta por 49 ml de una solución de 10,68 g de (Na₂HPO₄)2H₂O en 1 l de ddH₂O y 51 ml de una solución compuesta por 8,1 g de KH₂PO₄ en 1 l de ddH₂O. Se mezclaron 3 ml de esta solución con 1 ml de colorante Wright (Laboquímica). Esta solución final se añadió a los portaobjetos y se tuvieron en contacto durante el tiempo necesario para la tinción correcta de las bandas (observada mediante microscopía óptica). Tras la tinción, se realizó un lavado con ddH₂O a 4°C y se dejaron secar los portaobjetos.

Se capturaron imágenes de los cromosomas empleando un microscopio óptico y los cariotipos fueron descritos según el sistema ISCN 2020 (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2020)²⁵⁹.

5. Estudio de proliferación celular mediante ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo MTT se utiliza para medir la actividad metabólica celular, que se emplea como indicador de la viabilidad, la proliferación o la citotoxicidad celular. En este caso, se recurrió a esta técnica para comparar la tasa proliferativa de las líneas celulares resistentes a taxanos (CAL33-R y 32816-R) con la de las líneas celulares parentales (CAL33 y 32816). Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción de una sal de tetrazolio de color amarillo, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), a cristales de formazán, de color morado, por la enzima succinato deshidrogenasa en células metabólicamente activas. El formazán es un compuesto hidrofóbico que se puede solubilizar en DMSO. La absorbancia a 570 nm de esta solución se correlaciona de forma directa con la cantidad de células en cultivo metabólicamente activas que, de forma indirecta, reflejan la tasa de proliferación.

Para llevar a cabo este experimento, se sembraron en placas de 96 pocillos 2000 células en 100 µl de medio de cultivo por pocillo. Para cada línea celular se sembraron 6 pocillos para 3 tiempos diferentes: 0, 24 y 48 horas. Además, para cada tiempo se añadió solo medio de cultivo a 6 pocillos, a modo de blanco. Tras la siembra, las placas se mantuvieron en el incubador para permitir la adherencia de las células. El día siguiente se consideró el tiempo de referencia 0 horas y se procedió al revelado de esta placa. A partir de este punto temporal, las otras placas se dejaron en incubación 24 o 48 horas más.

Para realizar la medición a cada uno de los tiempos, en primer lugar se añadió el reactivo MTT disuelto en PBS 1X Na/K (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml. Después, incubó a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, se retiró el medio de cultivo y se añadieron 100 µl de DMSO por pocillo para disolver los cristales de formazán que se habían formado. Para ello, se realizó una incubación a temperatura ambiente y en agitación durante 5 minutos. Durante este proceso, las placas se mantuvieron en oscuridad en la medida de lo posible. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 nm de cada uno de los pocillos, tomando la absorbancia a 630 nm como referencia y realizando 25 medidas por pocillo. Para esto se empleó el espectrofotómetro y lector de microplacas *Infinite M200* (Tecan®).

Los resultados se analizaron realizando una normalización respecto a los valores obtenidos a 0 horas para cada una de las líneas celulares. Se realizaron 3 réplicas independientes de este experimento. El procedimiento se resume en la **Figura 21**.

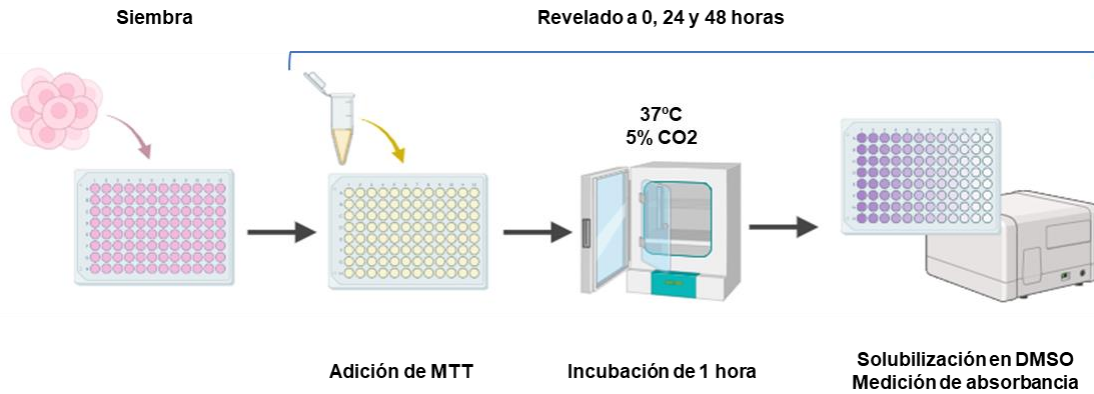


Figura 21. Procedimiento seguido en el ensayo de viabilidad MTT. Elaborado con imágenes de www.biorender.com.

6. Estudio de migración celular mediante el ensayo de cierre de herida

Con el objetivo de determinar los cambios en la capacidad migratoria de las líneas celulares resistentes a taxanos se llevó a cabo un ensayo de cierre de herida, también llamado ensayo de *scratch*. Este ensayo se basa en la realización de una herida en una placa de cultivo con una capa confluyente de células y en la monitorización posterior del proceso de migración de las células hasta cerrar esa herida, lo que permite calcular la velocidad de migración.

En primer lugar, se sembraron las líneas celulares CAL33, CAL33-R, 32816 y 32816-R en una placa de 6 pocillos. Concretamente, se sembraron 300000 células por pocillo 48 horas antes de realizar el ensayo, para garantizar una monocapa confluyente en este momento. Antes de añadir las células, en cada uno de los pocillos se colocaron dos moldes (Ibidi), que se adhieren a la placa y, cuando se retiran, dan lugar a heridas de dimensiones conocidas. El día previo al ensayo, el medio de cultivo fue sustituido por un medio sin FBS y con un 1% de P/S para detener la proliferación celular. En estas líneas celulares, el uso de un medio sin FBS no compromete la viabilidad celular. Así, el mismo día del ensayo, se retiraron los moldes con cuidado y se cambió el medio de cultivo por medio fresco sin FBS con un 1% de P/S.

La monitorización del proceso de cierre de herida se realizó a través de la toma de imágenes con una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases NIKON ECLIPSE TE-2000-E. Se establecieron las coordenadas de posición de las regiones de las distintas heridas y se tomaron fotos en esos puntos cada 30 minutos durante 24 horas. Este microscopio permite mantener las células en una atmósfera a 37°C y 5% de CO₂. Se realizaron tres réplicas independientes de este ensayo.

Para el análisis de las imágenes se usó el programa Fiji (Fiji Is Just ImageJ) en su versión 2.9.0. Este software incluye la herramienta *MRI Wound Healing Tool* que permite medir el área libre de células de la herida en cada uno de los puntos temporales establecidos. A partir de este parámetro se puede calcular el porcentaje del área de la herida ocupado a cada tiempo, lo que representa una medida indirecta de la velocidad de migración.

7. Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares

El papel de las EVs en resistencia a quimioterapia está bien establecido, aunque no está caracterizado por completo. Con el objetivo de establecer las diferencias en la cantidad, el tamaño y el contenido de las EVs liberadas por células resistentes y sensibles a taxanos, se aislaron dos fracciones de EVs de distinto tamaño (10K y de 100K) por ultracentrifugación y, posteriormente, se caracterizaron empleando distintas técnicas. En este estudio se emplearon únicamente la línea celular parental CAL33 y su correspondiente línea celular resistente a taxanos, CAL33-R.

7.1. Aislamiento de vesículas extracelulares por ultracentrifugación

El primer paso para el aislamiento de EVs por ultracentrifugación fue la expansión de las células en cultivo hasta tener 24 placas P150 durante 72 horas en el incubador, con medio de cultivo RPMI con L-glutamina suplementado con 10% de FBS depletado y un 1% de penicilina/estreptomicina. Pasado este tiempo, se recogió el medio de todas las placas y se procedió al aislamiento de EVs. El proceso de expansión de células se resume en la **Figura 22**. Es necesario depletar el FBS para suplementar el medio en el último paso de la expansión para evitar el aislamiento de EVs del propio FBS. Este proceso se realizó mediante ultracentrifugación a 100000 rcf, durante 18 horas y a 4°C, en el equipo *Beckman Coulter Optima XPN-100 Ultracentrifuge* (Life Sciences), con un rotor tipo 70Ti y tubos tipo 26,9 ml Quickseal.

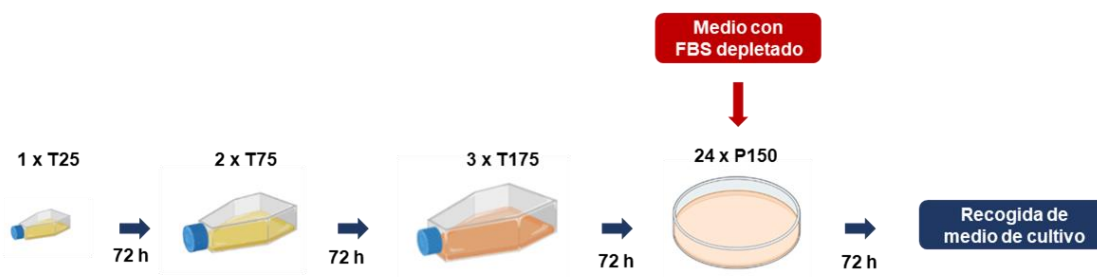


Figura 22. Proceso de expansión de las células en cultivo para el aislamiento de EVs.

El protocolo de aislamiento de EVs se basó en lo descrito en la literatura²⁶⁰. Se recogió el medio de cultivo a partir de 24 P150 que llevaban 72 horas en cultivo, pasándolo a tubos de 50 ml y se mantuvo en hielo. Se realizó una centrifugación a 4°C y 2000 rcf durante 10 min. Se pasó el medio a nuevos tubos y se descartó el pellet, con células muertas y restos celulares. A continuación, se transfirió el medio a tubos de plástico apropiados para realizar una centrifugación de alta velocidad. Se tararon los tubos empleando una balanza analítica y se completó el volumen con PBS 1X Na/K estéril. Después, se realizó una centrifugación a alta velocidad a 4°C y a 10000 rcf durante 30 minutos en el equipo *Beckman Coulter Avanti J-26S* (Life Sciences) usando el rotor JA-25.50.

Al finalizar esta centrifugación, se pasó el medio a los tubos de ultracentrífuga Quickseal de 26,9 ml y se mantuvo en hielo. Por otra parte, se resuspendieron todos los pellets resultantes en PBS 1X Na/K estéril, para hacer un lavado, y se juntaron en un único tubo. Se repitió la centrifugación de alta velocidad anterior, en las mismas condiciones. Después, se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet resultante en 100 µl de PBS 1X Na/K estéril y filtrado con filtros de 0,2 µm. Así, se completó el aislamiento de la fracción de EVs de 10k, que tienen mayor tamaño. Las EVs se conservaron a -80°C.

Por otro lado, los tubos de ultracentrífuga con medio, mantenidos en hielo, se tararon, permitiendo un error máximo de $\pm 0,020$ g entre todos los tubos y un error máximo de $\pm 0,010$ g entre los tubos enfrentados en la ultracentrífuga. Después, se llevó a cabo una ultracentrifugación a 4°C y 100000 rcf durante 70 minutos empleando el equipo *Beckman Coulter Optima XPN-100 Ultracentrifuge* (Life Sciences), con un rotor tipo 70Ti. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendieron todos los pellets en PBS 1X Na/K estéril y se juntaron en un único tubo. Tras tarar este tubo y un balance, se repitió la ultracentrifugación anterior. Por último, se descartó el sobrenadante y se disolvió el pellet resultante en 100 µl de PBS 1X Na/K estéril y filtrado con filtros de 0,2 µm. De este modo, se completó el aislamiento de la fracción de EVs de 100k, de menor tamaño. Las EVs de 100k también se conservaron a -80°C.

Este proceso se realizó por triplicado para cada una de las líneas celulares, CAL33 y CAL33-R. El procedimiento se resume de forma esquemática en la **Figura 23**.

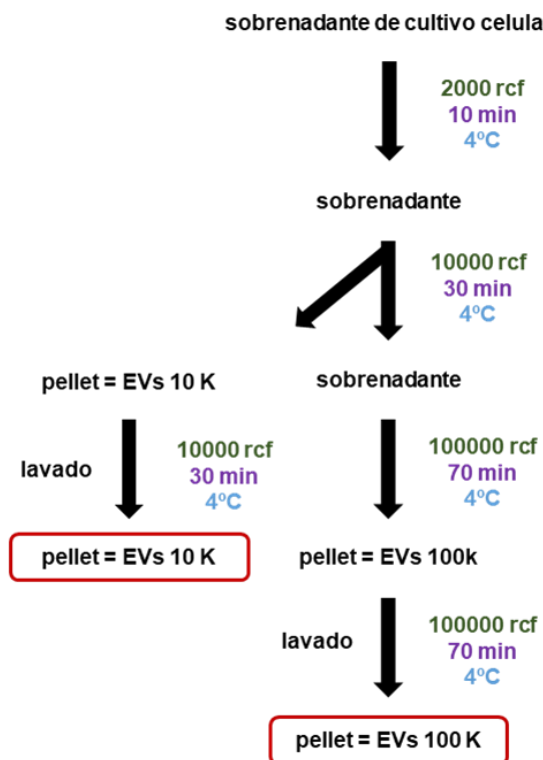


Figura 23. Procedimiento seguido para el aislamiento de EVs a partir de la línea celular parental CAL33 y resistente a taxanos CAL33-R.

Además, en cada aislamiento de EVs se despegaron las células de tres de las placas P150 y se contaron en una cámara de Neubauer, estimando el número de células totales para poder establecer el número de EVs por célula. También se realizó una extracción de proteínas de 1 placa por condición y se guardaron los *pellets* celulares de 3 placas por condición. Todas estas muestras se guardaron a -80°C.

Esta parte del trabajo se llevó a cabo durante una estancia internacional en el grupo Cancer Drug Resistance del Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3s) en Oporto (Portugal).

7.2. Caracterización de vesículas extracelulares por análisis de rastreo de nanopartículas

El análisis de rastreo de nanopartículas, en inglés *nanoparticle tracking analysis* (NTA), permite visualizar y analizar partículas en una suspensión líquida, empleando las propiedades de dispersión de la luz y del movimiento browniano. Con esta técnica fue posible determinar el tamaño y la concentración de las EVs aisladas a partir de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R para cada una de las réplicas del ensayo. Se empleó el equipo *NanoSight NS300* con el software NTA 3.2 Dev Build 3.2.16. Para la captura, se

utilizó la cámara sCMOS, con un nivel de cámara de 12-13 para las EVs de 10K (que se diluyeron 1:10 en PBS 1X Na/K) y de 15 para las EVs de 100k (que se diluyeron 1:100 en PBS 1X Na/K).

7.3. Visualización de vesículas extracelulares mediante microscopia electrónica de transmisión

Para comprobar el correcto aislamiento de las EVs y completar su caracterización, se capturaron imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esto fue realizado en la plataforma de Histología y Microscopía Electrónica del Instituto de Investigação e Inovação em Saúde da Universidade do Porto (i3s) durante una estancia de investigación. Se empleó el equipo Transmission Electron Microscope Jeol JEM 1400 para capturar imágenes a 25000, 50000, 80000 y 100000 aumentos. Para TEM, las muestras se diluyeron 1:2 en el tampón HEPES/sacarosa. Las imágenes se analizaron con el software Fiji (*Fiji Is Just ImageJ*) en su versión 2.9.0.

8. Edición génica con la tecnología CRISPR/Cas9

En la actualidad, la edición génica es una herramienta muy importante tanto en el área de biología molecular como en el desarrollo de la terapia génica. Existen diversas técnicas, como el uso de meganucleasas, nucleasas con dedos de zinc, la tecnología TALEN (*Transcription activator-like effector nuclease*) y la tecnología CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*), que permiten escindir una secuencia de DNA concreta mediante su actividad endonucleasa. La tecnología CRISPR, basada en un mecanismo natural de defensa adaptativo en el sistema inmune de bacterias y arqueas ante la infección por patógenos, se ha convertido en los últimos años en una herramienta eficiente y precisa para editar el genoma de manera dirigida con múltiples aplicaciones en numerosas disciplinas. Existen tres sistemas CRISPR en función de la enzima encargada de realizar el corte en el DNA, siendo la Cas9 en el sistema CRISPR-II. De este modo, dos de los componentes esenciales de este sistema son la proteína Cas9 y el RNA guía (gRNA). El mecanismo se basa en el reconocimiento de la secuencia diana en el gen de interés mediado por el gRNA, la escisión llevada a cabo por la nucleasa Cas9 y, finalmente, la reparación de la rotura de doble cadena producida. La reparación de roturas de doble cadena (DSBR) se puede producir mediante reparación directa por homología (HDR) o unión de extremos no homólogos, en inglés *non-homologous end joining* (NHEJ). La reparación mediante HDR precisa de

una secuencia donadora que ejerza de molde y se emplea habitualmente para introducir alteraciones en la secuencia concretas. Por otra parte, la reparación del DNA por NHEJ puede dar lugar a alteraciones de la secuencia, como inserciones, deleciones o alteraciones en el marco de lectura que pueden causar la inactivación de un gen determinado, generando un *knockout* (**Figura 24**)^{261–263}.

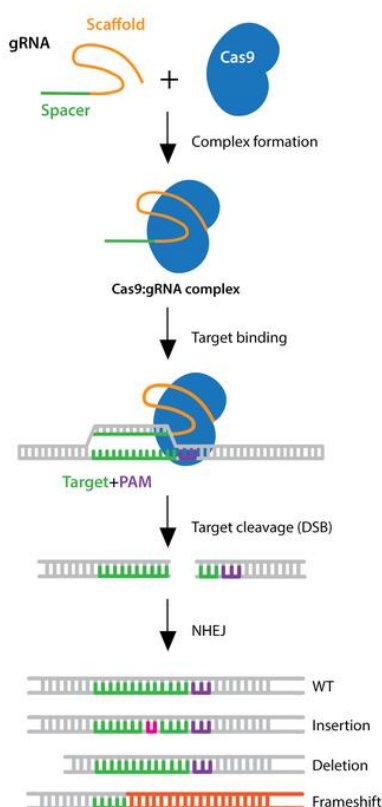


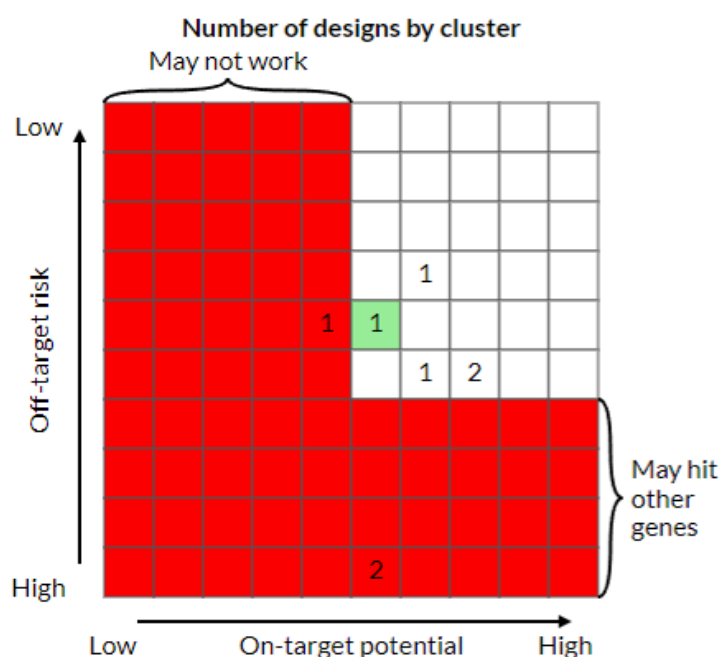
Figura 24. Proceso de generación de un *knockout* usando la tecnología CRISPR/Cas9. Obtenido de www.addgene.org²⁶⁴.

En este trabajo, se empleó la tecnología CRISPR-Cas9 para inactivar el gen *ATG7* en la línea celular de CECC 32816. Para ello, se diseñaron 3 gRNA específicos, se generaron las construcciones necesarias, se transfectaron las células 32816 y se realizó un *single cell sorting*, para obtener varios clones *knockout* para *ATG7*.

8.1. Diseño de gRNA

ATG7 es un gen que se encuentra localizado en la región 3p25.3 y cuenta con 32 exones. Su secuencia de referencia del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) tiene la siguiente identificación: NC_000003.12. Se empleó la base de datos del NCBI para obtener la secuencia y seleccionar la región diana frente a la cual dirigir los gRNA. Además, se tuvo en cuenta que existen 10 variantes transcripcionales de este gen. Para garantizar la inactivación de *ATG7* se seleccionó el primer exón común a todas las variantes transcripcionales, que se corresponde con el exón 10 de la variante

En este caso, se introdujo la secuencia correspondiente al exón 10 de la variante 1 de *ATG7* junto con las regiones intrónicas adyacentes. Se obtuvieron 8 gRNA candidatos y 3 de ellos se descartaron bien por tener un riesgo de presentar efectos no deseados elevado, bien por que podían no funcionar debido a un bajo potencial de generar el efecto deseado (**Figura 25**). De los 5 restantes, se seleccionaron 3 gRNA, muy próximos entre sí, para ser clonados en un vector de manera individual y ser co-transfectados en distintas combinaciones para favorecer la eficacia de la técnica. Los 3 gRNA seleccionados se muestran en la **Figura 26**.



77

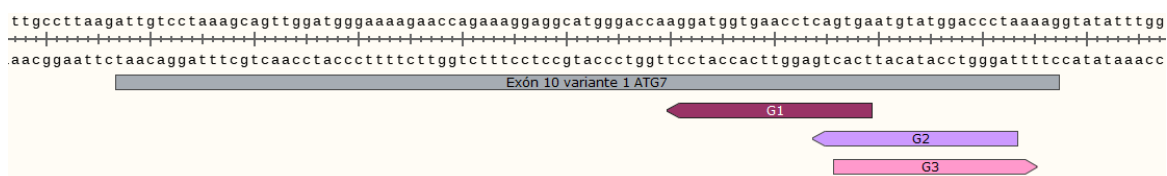


Figura 26. gRNA seleccionados para reconocer la secuencia diana localizada en el exón 10 de la variante 1 del gen ATG7.

Para la construcción de cada uno de los gRNA fue necesario diseñar dos secuencias de oligonucleótidos (denominados *up* y *low*) que presentan una cola que permite su integración en el vector seleccionado. Esta información se recoge en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos diseñadas para la construcción de los gRNA.

gRNA	Oligonucleótido <i>up</i>	Oligonucleótido <i>low</i>
gRNA-1	5' caccgTCACTGAGGTTACCATCCT 3'	5' aaacAGGATGGTGAACCTCAGTGAc 3'
gRNA-2	5' caccgTAGGGTCCATACATTCACCTG 3'	5' aaacCAGTGAATGTATGGACCCTAc 3'
gRNA-3	5' caccgGTGAATGTATGGACCCTAAA 3'	5' aaacTTTAGGGTCCATACATTCACc 3'

8.2. Clonación de gRNA en el vector PX458

Para transfectar las células con los componentes del sistema CRISPR/Cas9 fue necesario clonar los gRNA en un vector plasmídico. Se seleccionó el plásmido pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458), cuya estructura se encuentra en el repositorio de *addgene* con la referencia #48138. Esta se muestra en la **Figura 27**. Este vector tiene, bajo el control del promotor CMV, las secuencias de los genes *hSpCas9* y *EGFP*. Esto permite, por un lado, la escisión del DNA mediada por la proteína Cas9 y, por otro, seleccionar las células transfectadas mediante la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Cada gRNA previamente diseñado fue clonado individualmente en el plásmido, mediante la ligación con la secuencia gRNA *scaffold*, que se encuentra en el vector bajo el control del promotor U6. Esta ligación fue posible gracias a la presencia de un sitio de corte para la enzima BbsI. De este modo, empleando esta enzima, se puede digerir el plásmido y llevar a cabo la ligación insertando cada uno de los gRNA.

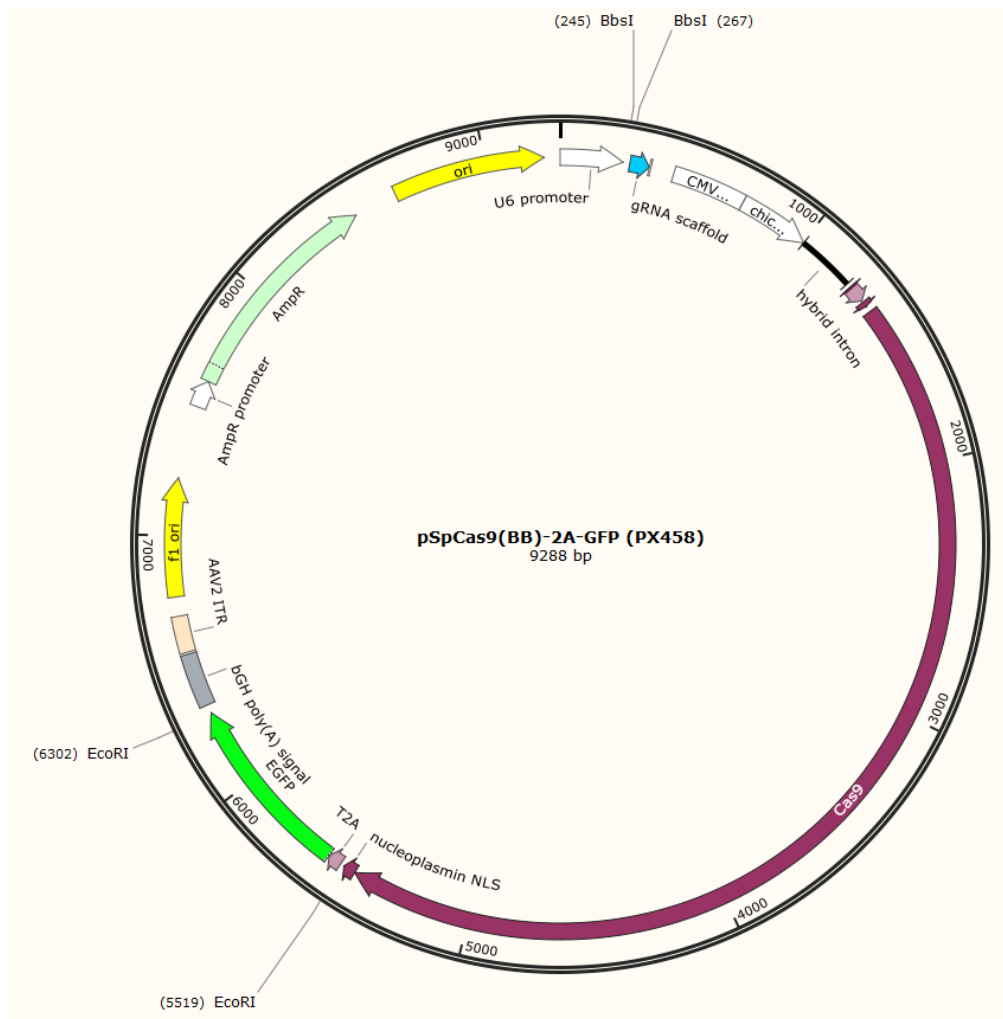


Figura 27. Esquema del vector PX458 empleado para la clonación de los gRNA. Se muestran los sitios de corte de la enzima BbsI. Elaborado con SnapGene® Viewer v.5.2.

Para clonar los gRNA en el vector, en primer lugar, se llevó a cabo la hibridación por complementariedad de bases de las dos secuencias de oligonucleótidos diseñadas para cada gRNA (up y low). Después, se fosforilaron los extremos cohesivos de esta secuencia de DNA de doble cadena generada para cada uno de los gRNA con la enzima polinucleótido quinasa T4 (PNKT4), que cataliza la transferencia de grupos fosfato a los extremos cohesivos. A continuación, se digirió el vector con la enzima BbsI y se llevó a cabo la ligación de los insertos en el vector. Por último, se fortaleció la reacción con la exonucleasa PlasmidSafe, que elimina DNA cromosómico bacteriano contaminante y digiere DNA lineal contaminante de modo que, en definitiva, permite la purificación final del plásmido protegiendo el DNA circular de doble cadena. Todos estos pasos, así como los reactivos empleados en cada uno de ellos, se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Etapas de la clonación de los gRNA en el vector PX458 y reactivos empleados.

Paso	Reactivo	Volumen (μl)
Hibridación y fosforilación de extremos cohesivos	Oligo <i>up</i> 100 μM	1
	Oligo <i>low</i> 100 μM	1
	Buffer enzima T4 10X	1
	PNK T4	0,5
	ddH ₂ O	6,5
	Volumen total	10
Digestión y ligación	Vector PX450 100 ng/μl	1
	Producto anterior 1:250	2
	<i>Fast digest buffer</i>	2
	DTT 10 mM	1
	ATP 10 mM	1
	Enzima Bspl (<i>fast digest</i> Bpi1)	1
	DNA ligasa T7	0,5
	ddH ₂ O	11,5
	Volumen total	20
Purificación y fortalecimiento de la ligación	Producto anterior	11
	Buffer PlasmidSafe 10X	1,5
	ATP 10 mM	1,5
	Exonucleasa PlasmidSafe	1
	Volumen total	15

Las condiciones de tiempo y temperatura para cada una de las reacciones anteriores, que se llevaron a cabo en un termociclador, se recogen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Condiciones de temperatura y tiempo para los distintos pasos de la clonación de gRNA en el vector PX458.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Hibridación y fosforilación de extremos cohesivos	37°C	30'	1
	95°C	5'	
	-5°C/minuto hasta 25°C	14'	
Digestión y ligación	37°C	5'	6
	23°C	5'	
	4	<i>Hold</i>	1
Purificación y fortalecimiento de la ligación	37°C	30'	1

8.3. Transformación de bacterias competentes

Tras completar la clonación individual de los distintos gRNA en el vector PX458, se realizó la transformación de bacterias competentes de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Estas bacterias incorporan el DNA plasmídico y este se duplica al igual que el DNA bacteriano de modo que, cuando se dividen, pasa a las células hijas. Así, es un modo de obtener múltiples copias del plásmido que, tras el crecimiento de las bacterias, se puede purificar.

Para ello, se trabajó en todo momento en un ambiente estéril. En primer lugar, se descongelaron las bacterias competentes, conservadas a -80°C, en hielo. A continuación, se mezclaron 2 μ l de cada uno de los vectores clonados anteriormente con 50 μ l de células DH5 α . En paralelo, como control, se mezclaron también 2 μ l del vector PX458 sin gRNA con 50 μ l de células DH5 α . Se realizó una incubación de 30 minutos en hielo. Posteriormente, las células se sometieron a un choque térmico, a 42°C durante 30 segundos exactos, realizando una incubación posterior de 5 minutos en hielo. Después, para la recuperación de las células, se añadieron 250 μ l de medio 2XTY sin ampicilina por condición y se llevó a cabo una incubación a 37°C durante 60 minutos en una estufa con agitación. Tras esta incubación, se realizó una centrifugación a máxima velocidad durante 10 segundos y se descartó el sobrenadante. Cada pellet bacteriano se resuspendió en 100 μ l de medio 2XTY y se sembró en una placa con medio TYE-agar y 100 μ g/ml de ampicilina previamente atemperada con un asa de Digralsky estéril. Se dejaron secar durante 15 minutos y finalmente se incubaron durante toda la noche en una estufa a 37°C en posición invertida.

El vector PX458 contiene en su estructura el gen de resistencia a ampicilina. Por este motivo, tras 16 horas se observó la formación de colonias en las placas. Se picaron tres colonias con un palillo estéril para cada una de las condiciones y se introdujeron en un tubo con 2 ml de medio 2XTY con 100 μ g/ml de ampicilina. Los tubos se incubaron a 37°C, en una estufa con agitación, durante 24 horas, para permitir el crecimiento de las bacterias. Después, se procedió a la extracción y purificación del DNA plasmídico. Además, antes de introducirlas en el tubo, se sembró una estría de cada una de ellas en una nueva placa con medio TYE-agar y 100 μ g/ml de ampicilina. Se dejó esta placa en una estufa a 37°C durante 16 horas y después se conservó a 4°C hasta su uso posterior.

8.4. Extracción y purificación de DNA plasmídico

8.4.1. Extracción y purificación de DNA plasmídico mediante *minipreps*

Para extraer el DNA plasmídico de las células bacterianas transformadas se empleó el kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). Se partió de los cultivos bacterianos preparados anteriormente, tras 24 horas de incubación a 37°C. El primer paso fue una centrifugación a 8000 rpm durante 2 minutos. Se descartó el sobrenadante y al pellet de células bacterianas se le añadieron 250 µl de la solución de resuspensión, se mezcló mediante vórtex y se pasó a un tubo apto para una microcentrífuga. Después, se añadieron 250 µl de solución de lisis y se homogenizó por inversión. A continuación, se incorporaron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló de nuevo por inversión. Se realizó una centrifugación a 14000 rpm durante 5 minutos para precipitar el debris celular y el DNA del cromosoma bacteriano.

El sobrenadante se pasó mediante pipeteo a una columna propia del kit comercial. Se realizó una nueva centrifugación a 14000 rpm durante 1 minuto para permitir la unión del DNA plasmídico a la membrana de la columna. Posteriormente se realizaron dos lavados añadiendo 500 µl de la solución de lavado y centrifugando a 14000 rpm durante 1 minuto. Se realizó una centrifugación adicional para secar la columna.

Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo y se añadieron 50 µl de *buffer* de elución. Se realizó una incubación de dos minutos y se centrifugaron los tubos a 14000 rpm durante 2 minutos para eluir el DNA plasmídico. La concentración de DNA se cuantificó mediante espectrofotometría con el equipo *NanoDrop® 2000* y las muestras se conservaron a -20°C.

8.4.2. Extracción y purificación de DNA plasmídico mediante *maxipreps*

Para obtener mayor cantidad de los plásmidos PX458, PX458-gRNA-1, PX458-gRNA-2 y PX458-gRNA-3, tras la comprobación mediante secuenciación Sanger la correcta inserción de los distintos gRNA con el DNA plasmídico extraído mediante *minipreps*, se realizaron *maxipreps* empleando el kit comercial *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). En este caso, se partió de las estrías sembradas previamente. Se picó una de ellas por condición con un palillo estéril y se introdujo en matraz con 250 ml de medio 2XTY con 100 µg/ml de ampicilina. Se dejó crecer durante 24 horas y, tras este tiempo, se procedió a la extracción y purificación del DNA plasmídico con el kit comercial anteriormente mencionado.

En primer lugar, se realizó una centrifugación a 5000 rcf durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, conservando el pellet de células bacterianas. A este se le añadieron 6 ml de solución de resuspensión y se mezcló mediante vórtex. A continuación, se añadieron 6 ml de solución de lisis y se homogenizó la mezcla por inversión. Se dejó incubar durante 3 minutos a temperatura ambiente. Después, se incorporaron 6 ml de solución de neutralización, volviendo a mezclar por inversión. Se añadieron 0,8 ml de reactivo de unión a endotoxinas, volviendo a invertir. Se realizó una centrifugación a 48000 rcf durante 20 minutos para precipitar el debris celular y el DNA cromosómico bacteriano, empleando la centrífuga de alta velocidad Beckman Coulter Avanti J-26S con un rotor JA-25.50.

A continuación, se pasó el sobrenadante a un nuevo tubo por decantación y se añadió 1 volumen de etanol al 96%, mezclando por inversión. Se transfirió parte de la muestra a una columna incluida en el kit comercial y se centrifugó a 2000 rcf durante 3 minutos, para permitir la unión del DNA plasmídico a la membrana de la columna. Posteriormente, se transfirió la parte restante y se procedió del mismo modo. Después se realizaron dos lavados, añadiendo en cada uno de ellos una solución de lavado diferente incluidas en el kit (I y II) y centrifugando a 3000 rcf durante 2 minutos. Finalmente, se añadieron 700 µl de *buffer* de elución a la columna y, tras una incubación de 2 minutos, se realizó una centrifugación a 3000 rcf durante 5 minutos que permitió la elución del DNA plasmídico. La concentración de DNA se cuantificó mediante espectrofotometría con el *NanoDrop*® 2000, se preparó una alícuota a 1 µg/µl y las muestras se conservaron a -20°C.

8.5. Confirmación de la inserción de los gRNA en el vector PX458 mediante secuenciación Sanger

Para comprobar la correcta inserción de los gRNA en el vector PX458 se procedió a la secuenciación automática por el método de Sanger a partir del promotor U6, en sentido directo o *forward*. Esto se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del ADN de la Universidad de Salamanca, donde se empleó un secuenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Se prepararon para secuenciar 300 ng de cada una de las construcciones (del DNA extraído mediante *miniprep*), con 2 µl de oligonucleótido U6F (3 pmol), cuya secuencia es 5' GAGGGCCTATTTCCCATGATT 3', en un volumen total de 8 µl, completado con ddH₂O.

En la **Figura 28** se muestran las secuencias de cada una de las construcciones, correspondientes al vector PX458 con los distintos gRNA. De este modo, se comprobó

que se habían insertado correctamente y se pudo proceder con el experimento de edición génica al validar todos los vectores empleados.

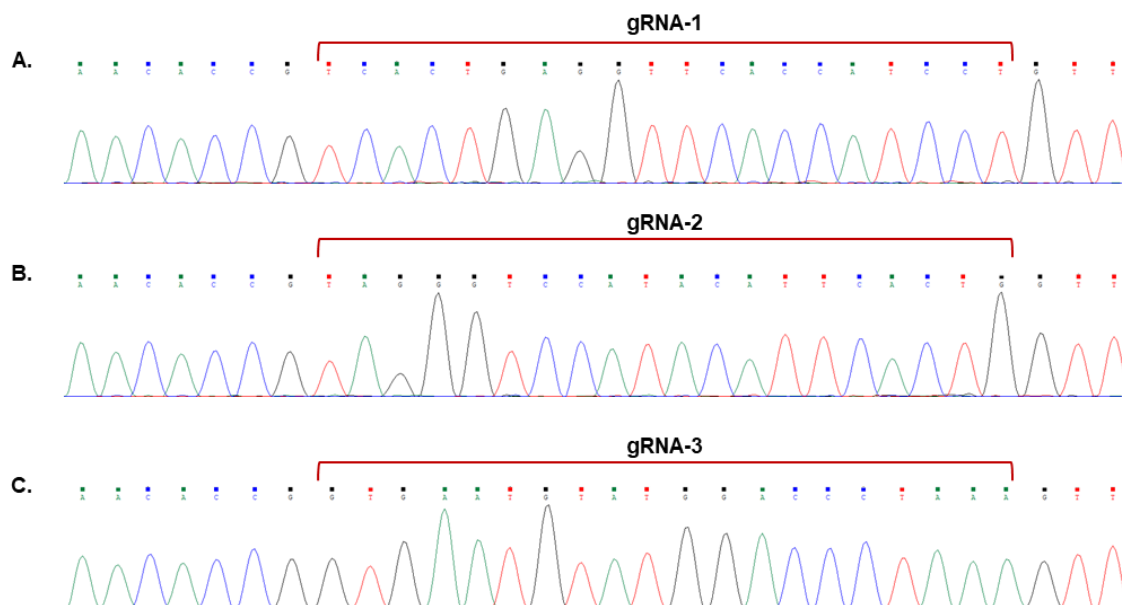


Figura 28. Secuencias de los plásmidos PX458-gRNA-1 (A), PX458-gRNA-2 (B) y PX458-gRNA-3 (C). Comprobación de la correcta inserción de los distintos gRNA en el vector PX458 empleando el oligonucleótido U6F para secuenciar.

8.6. Transfección de la línea celular 32816 mediante electroporación

El siguiente paso en el proceso de edición génica mediante CRISPR/Cas9 fue la transfección de la línea celular de CECC 32816. Se usaron distintas combinaciones de los vectores con diferentes guías para favorecer la eficiencia en la inactivación del gen *ATG7*. Además, las células también se transfectaron con el PX458 vacío, sin gRNA, como control.

Tras una puesta a punto, se seleccionó la electroporación como método de transfección, por presentar una mayor eficacia en esta línea celular. La electroporación modifica la permeabilidad de las membranas de las células mediante la aplicación de un pulso eléctrico que aumenta la conductividad eléctrica, permitiendo la entrada del plásmido de interés en las células.

De este modo, se contaron las células 32816 en cultivo con una cámara de Neubauer y se prepararon para electroporar 1×10^6 células por condición, resuspendidas en 100 μ l de *buffer* de transfección casero (5 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 120 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 7,2, 25 mM succinato de sodio y 25 mM manitol) con 1 μ g de cada plásmido. Las combinaciones de vectores transfectadas fueron las siguientes:

- PX458 vacío
- PX458-gRNA-1 + PX458-gRNA-2
- PX458-gRNA-1 + PX458-gRNA-3
- PX458-gRNA-2 + PX458-gRNA-3
- PX458-gRNA-1 + PX458-gRNA-2 + PX458-gRNA-3

De este modo, se electroporaron 5 condiciones diferentes. Para ello, se empleó el equipo *Nucleofector Amaxa* (Lonza) con el programa T-020. Tras la electroporación, se recogieron las células con 1 ml de medio de cultivo RPMI suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S y se sembraron en placas de cultivo P100 con otros 9 ml de medio de cultivo.

Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo durante 48 horas y después se procedió a separar de manera individual las células GFP+ (que habían incorporado el plásmido) por citometría de flujo (*single cell sorting*).

8.7. *Single cell sorting* mediante citometría de flujo

48 horas después de la transfección, se llevó a cabo la separación individual de células que expresaban GFP, es decir, que habían incorporado al menos uno de los plásmidos transfectados, lo que se conoce como *single cell sorting*. Se utilizó el citómetro de flujo FACS Aria™ III (BD Biosciences). Para preparar las células para la citometría, se lavaron con PBS 1X Na/K, se despegaron las células con TrypLE Express 1X, se resuspendieron con medio de cultivo y se centrifugaron a 800 rpm 3 minutos para obtener el pellet celular. Este se resuspendió en 250 µl de PBS 1x Na/K con EDTA a una concentración de 5 mM, estéril. Se procesaron de este modo también, además de las células transfectadas, las células 32816 sin editar, para ser usadas como control negativo de fluorescencia.

En primer lugar, se pasaron por el citómetro las células 32816 sin transfectar y así se determinó el umbral de fluorescencia verde. Después, se fueron pasando las células transfectadas con las distintas combinaciones de vectores. En todos los casos, la eficiencia de transfección fue de un 15-20%. Se separaron 3 placas de 96 pocillos por condición en las que se sembró una única célula GFP+ por pocillo. A estas placas de 96 pocillos se les habían añadido previamente 150 µl de medio RPMI suplementado con un 20% de FBS y un 1% de P/S.

Todas las placas se mantuvieron en cultivo durante 2-3 semanas, momento en el que se comenzó a observar proliferación clonal en algunos pocillos. Estos clones se

expandieron y se fueron pasando a placas de 24, 12 y 6 pocillos sucesivamente, hasta ser cultivados en placas P100. En este momento, para determinar en qué clones se había conseguido inactivar el gen *ATG7*, se extrajo proteína. Finalmente, se seleccionaron 3 clones *knockout* para *ATG7* y 3 clones que habían sido transfectados con el plásmido vacío para proceder con su caracterización y realizar distintos experimentos. En estos clones, también se extrajo DNA y RNA y se comprobó la edición génica por secuenciación Sanger y PCR cuantitativa comparativa.

9. Análisis de la respuesta a fármacos

En este trabajo se estudió la respuesta de las distintas líneas celulares a varios fármacos. Se realizaron ensayos de respuesta a fármacos en las líneas celulares de CECC (CAL33, 32816 y 32860), en las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos (CAL33-R y 32816-R) y, tanto en los clones de la línea celular 32816 *knockout* para *ATG7* (32816-ATG7-KO1, 32816-ATG7-KO2 y 32816-ATG7-KO3) como en los clones de esta misma línea celular transfectados con el plásmido px458 vacío (32816-PX1, 32816-PX2 y 32816-PX3).

Se emplearon distintas técnicas para analizar la respuesta a los distintos fármacos, incluyendo el ensayo de viabilidad celular MTT, el ensayo de apoptosis y el análisis de ciclo celular.

9.1. Fármacos

En este trabajo se emplearon distintos fármacos para la realización de ensayos en líneas celulares, incluyendo tanto fármacos empleados actualmente en la clínica como un nuevo agente antimitótico desarrollado en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Universidad de Salamanca cuyo potencial antitumoral se está testando actualmente en modelos celulares (**Tabla 7**). Asimismo, el verapamilo se empleó para inhibir la función transportadora de la bomba de eflujo MDR1, no para evaluar su efecto citotóxico.

Tabla 7. Fármacos empleados, mecanismo de acción y efecto celular. Se indica también la concentración del stock y la procedencia del fármaco.

Fármaco	Mecanismo de acción	Efecto celular	Stock	Procedencia
Paclitaxel	Estabilización de la polimerización de los microtúbulos	Antimitótico	6 mg/ml (7026 μ M) Suero fisiológico	Teva Genéricos Española S.L.
Docetaxel	Estabilización de la polimerización de los microtúbulos	Antimitótico	20 mg/ml Suero fisiológico	Aurovitas Spain S.A.U.
5-FU	Inhibición de la enzima timidilato sintasa	Antimetabolito	50 mg/ml Suero fisiológico	Accord Healthcare S.L.U.
Cisplatino	Unión al DNA	Daño en el DNA	1 mg/ml (3330 μ M) Suero fisiológico	Pharmacia Nostrum S.A.
Olaparib	Bloqueo de la enzima PARP	Inhibición de la reparación de daño en el DNA	Pastillas 150 mg 34,5 mM DMSO	Lynparza (AstraZeneca)
Verapamilo	Inhibición de la función transportadora de MDR1	Bloqueo de canales de calcio	100 mM ddH ₂ O	Thermo Fisher Scientific

9.2. Ensayo de viabilidad celular MTT

El ensayo de viabilidad celular MTT, técnica descrita previamente para el análisis de la proliferación celular, también se empleó para determinar la respuesta a distintos fármacos.

En este caso, se sembraron 2000 células en 100 μ l de medio de cultivo por pocillo en placas de 96 pocillos. La respuesta a los distintos fármacos se analizó a 24, 48 y 72 horas. Al día siguiente del contaje y siembra de células, se adicionaron los distintos tratamientos. Se seleccionaron 6 dosis diferentes de cada fármaco en función de lo descrito en la literatura y experimentos previos del laboratorio (**Tabla 8**). En el caso del verapamilo, este fármaco se empleó para inhibir la función transportadora de MDR1, a una concentración constante que no afecta a la viabilidad celular, descrita en la literatura²⁶⁵, en combinación con distintas dosis paclitaxel y docetaxel. De este modo, se pudo determinar si, en las células resistentes CAL33-R y 32816-R, se producía una reversión de la resistencia a taxanos al inhibir el funcionamiento la bomba de eflujo MDR1. Además, a cada tiempo, se mantuvieron células sin tratar, como control, y pocillos con medio a los que se les adicionó el volumen máximo de vehículo para cada fármaco, como blanco. El revelado y medición de la absorbancia se llevó a cabo tal y como está descrito en el apartado 5 de la sección “Materiales y Métodos”.

Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia, a cada uno de ellos se les restó el valor del blanco y se realizó una normalización respecto a los valores obtenidos para las células control sin tratar a cada tiempo. Se realizaron 3 réplicas independientes de este experimento. Se determinó la IC50 a los distintos tiempos de tratamiento empleando el software *Graphpad Prism 9.4.1*.

Tabla 8. Dosis empleadas en los ensayos de viabilidad celular de respuesta a distintos fármacos.

Fármaco	Dosis					
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Paclitaxel	2,5 nM	5 nM	10 nM	15 nM	30 nM	50 nM
Docetaxel	0,1 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml
5-FU	0,625 µg/ml	2,5 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml	80 µg/ml
Cisplatino	2 µM	5 µM	10 µM	20 µM	30 µM	50 µM
Olaparib	0,05 mM	0,1 mM	0,25 mM	0,5 mM	0,75 mM	1 mM
Verapamilo	10 µM					

9.3. Ensayo de apoptosis

En algunos casos, se realizaron ensayos de apoptosis mediante citometría de flujo para determinar el efecto de los fármacos en la muerte celular. Estos ensayos se basan en el marcaje de las células con anexina V, que se une a la fosfatidilserina presente en la membrana celular en células apoptóticas, y con yoduro de propidio (PI), que penetra en las células necróticas que han perdido la integridad de sus membranas. De este modo, se puede identificar la población de células vivas, apoptóticas, necro-apoptóticas y necróticas (**Figura 29**).

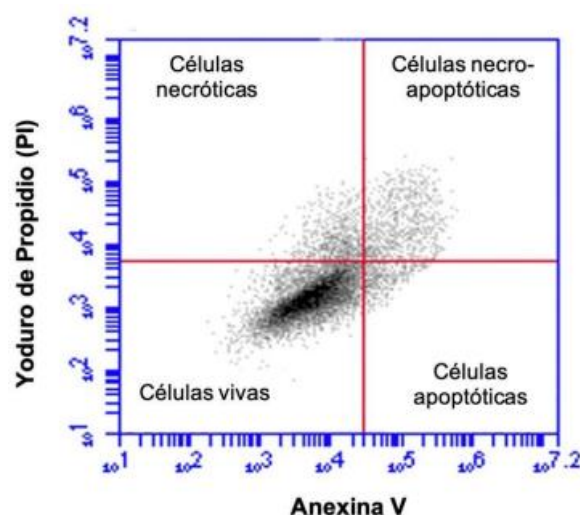


Figura 29. Representación gráfica de las poblaciones celulares identificadas mediante citometría de flujo mediante el ensayo de apoptosis. En el eje de abscisas se muestra la detección de FITC (Anexina V) y en el eje de ordenadas la detección de PE (PI).

Para realizar este ensayo, se sembraron 60000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. 24 horas tras la siembra, se adicionó el fármaco a los distintos pocillos. Las concentraciones empleadas se recogen en la **Tabla 9**. Al igual que en el ensayo de viabilidad celular, en el caso del verapamilo se mantuvo una concentración constante de fármaco que no afecta a la viabilidad celular, y se combinó con distintas dosis de paclitaxel y docetaxel. Se mantuvieron también las células sin tratamiento como control. 48 horas después, se realizó el ensayo de apoptosis. Para ello, se empleó el kit comercial *Anexina V FITC Apoptosis detection kit* (Immunostep S.L).

En primer lugar, se recogió el sobrenadante de los distintos pocillos y se añadió a tubos de citómetro. Las células adheridas se lavaron con 500 μ l de PBS 1X Na/K, que también se añadió a los tubos de citómetro. Después, se despegaron con el agente de disociación TrypLE Express 1X, se resuspendieron con medio y este se añadió a los tubos correspondientes. A continuación, se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS 1X Na/K y se repitió la centrifugación.

Finalmente, el botón celular se resuspendió en 100 μ L de la reacción de marcaje, según las instrucciones del kit comercial (98 μ L de *Binding Buffer*, 1 μ L de Anexina V, 1 μ L de PI). Se prepararon también células sin tratamiento y sin marcaje, para determinar los umbrales de fluorescencia, y células sin tratamiento marcadas con cada uno de los reactivos de manera individual, para realizar la compensación del citómetro. La mezcla se incubó durante 15 minutos en oscuridad, tiempo tras el cual se procedió a la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo *BD Accuri™ C6 Plus Flow*

Cytometer. Se recogieron datos de como mínimo 30000 células por condición y cada condición se analizó por duplicado. El análisis se realizó con el software asociado al citómetro y se representaron gráficamente los porcentajes de células vivas en las distintas condiciones del ensayo. Además, se hicieron tres réplicas independientes de este experimento.

Tabla 9. Dosis empleadas en los ensayos de apoptosis de respuesta a distintos fármacos.

Fármaco	Dosis	
	D1	D2
Paclitaxel	4 nM	30 nM
Docetaxel	4 ng/ml	25 ng/ml
Verapamilo	10 μ M	

9.4. Análisis de ciclo celular

Para la determinación del efecto de fármacos en el ciclo celular se cuantificó el contenido de DNA de las células tratadas y sin tratar mediante citometría de flujo, pudiendo establecer el porcentaje de células en las distintas fases del ciclo celular: sub-G0 (muertas), G0/G1, S y G2/M. En este ensayo se emplearon las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos: CAL33, 32816, CAL33-R y 32816-R.

Para ello, se sembraron 60000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, se adicionó el fármaco a los distintos pocillos, por duplicado, y se mantuvo durante 48 horas. También se mantuvieron las células sin tratamiento como control. 48 horas después, se recogió el sobrenadante de los distintos pocillos y se transfirió a tubos de 15 ml. Las células adheridas se lavaron con 500 μ l de PBS 1X Na/K, que también se añadió a los tubos de citómetro. Después, se despegaron con el agente de disociación TrypLE Express 1X, se resuspendieron con medio y este se añadió a los tubos correspondientes. A continuación, se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 minutos. Se retiró el sobrenadante, se realizó un lavado con PBS 1X Na/K y se repitió la centrifugación.

Las células se fijaron con etanol al 70% en PBS 1X Na/K y se realizó una incubación de al menos 1 hora a 4°C. Después, se realizaron una serie de lavados con PBS 1X Na/K y, finalmente, las células se marcaron con 50 μ g/ml de PI (Sigma-Aldrich) y se trataron con 100 μ g/ml RNasa A (Roche). Tras una incubación de 1 hora, en oscuridad

y a temperatura ambiente, las muestras se adquirieron con el citómetro de flujo *BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer*. Se prepararon duplicados de cada condición, analizando 50000 células en cada caso. Los perfiles de ciclo celular se obtuvieron con el software asociado al citómetro. Además, se hicieron tres réplicas independientes de este experimento.

10. Análisis de la respuesta a radiación

Dado que el régimen TPF se administra de manera habitual en la clínica como quimioterapia de inducción previa a la radioterapia, se decidió analizar la respuesta de las líneas celulares de CECC a la radiación, para determinar si la resistencia a taxanos afectaba a la sensibilidad a este tratamiento. Para ello, se emplearon las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos: CAL33, 32816, CAL33-R y 32816-R.

Para ello, se sembraron 50000 células en placas de 60 mm de diámetro y, al día siguiente, se irradiaron con tres dosis diferentes por duplicado: 5 Gy, 7,5 Gy y 10 Gy. Además, se mantuvieron en cultivo las células sin tratar como control. 7 días después, las células se procesaron para realizar un ensayo de apoptosis, tal y como se ha descrito previamente, y se adquirieron mediante citometría de flujo, analizando al menos 30000 células por condición. De este modo, se determinó el porcentaje de células vivas para cada línea celular y dosis, realizando una comparación entre las líneas celulares parentales y sus correspondientes líneas celulares resistentes a taxanos. Se realizaron tres réplicas independientes de este experimento.

11. Ensayo COMET para la determinación del daño celular

Con el objetivo de comparar el nivel de daño en el DNA tanto basal como tras el tratamiento con un agente inductor de daño, como el cisplatino, de las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos, se realizó un ensayo COMET.

Para ello, se sembraron 250000 células por pocillo en una placa de 6 pocillos. Al día siguiente, tras la adhesión de las células a las placas, se trataron con dos dosis diferentes de cisplatino. Además, se realizó un tratamiento con sus respectivos vehículos y se mantuvieron en cultivo células sin tratar como controles. En este caso, para cada par de líneas celulares (parental y su correspondiente resistente a taxanos), se usaron dos concentraciones de cisplatino diferentes, correspondientes con la IC50 a 24 horas de cada una de las dos líneas celulares en cuestión (**Tabla 10**). El tratamiento

se dejó durante 2 horas, ya que para este ensayo la viabilidad celular tiene que ser superior al 80%.

Tabla 10. Dosis de cisplatino empleadas en el ensayo COMET. Se muestra también el volumen de vehículo añadido como control de cada uno de los tratamientos. Para cada par de líneas celulares (parental-resistente a taxanos) se usaron las dos IC50.

	Línea celular			
	CAL33	CAL33-R	32816	32816-R
IC50 24 h cisplatino (μM)	24,23	20,61	17,46	7,78
Vehículo ($\mu\text{l/pocillo}$)	14,55	12,38	20,49	4,67

Tras las 2 horas de tratamiento, las células se despegaron y se contaron para cada una de las condiciones. Se transfirieron 15000 células por condición a un tubo de 1,5 ml, que se mantuvo en hielo. De las células control se separaron dos tubos, uno de ellos para ser usado como control positivo posteriormente. Se realizó una centrifugación a 4°C y 5000 rpm durante 1 minuto y se retiró el sobrenadante. Por otro lado, se preparó una disolución al 0,5% de agarosa de punto de fusión bajo (LMP) en PBS a 37°C. Entonces, se resuspendió el botón celular con 200 μl de la solución de agarosa LMP y se añadieron dos gotas (de aproximadamente 75 μl cada una), correspondientes a duplicados de la misma condición, a un portaobjetos pretratado. Rápidamente, se cubrieron cada una de ellas con un cubreobjetos de 22 x 22 mm. De manera previa al desarrollo del ensayo, se pretrataron los portaobjetos a utilizar sumergiéndolos en una solución al 1% de agarosa con punto de fusión normal (NMP) en ddH₂O. Los portaobjetos con las células se dejaron a 4°C durante 45 minutos o hasta que la solución de agarosa dejó de ser líquida. A partir de aquí, todos los pasos se realizaron en una cámara fría a 4°C.

A continuación, se retiraron los cubreobjetos y uno de los portaobjetos con células sin tratar se sumergió en una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 5 μM en PBS durante 5 minutos, para dañar el DNA y tener un control positivo del ensayo. Después, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con ddH₂O. Seguidamente, se sumergieron todos los portaobjetos en una solución de lisis (NaCl 2,5M, Na₂EDTA 100 mM, Tris Base 10 mM, NaOH 7g/l, 1% Tritón X-100 en ddH₂O, pH 10) en oscuridad durante 2 horas. Tras esta incubación, se realizó un lavado en ddH₂O durante 5 minutos, seguido de un tratamiento alcalino con *buffer* de electroforesis (3 M NaOH, 200 mM Na₂EDTA en ddH₂O, pH $\geq$ 13) durante 5 minutos. Posteriormente, se transfirieron todos los portaobjetos a una cubeta de electroforesis horizontal lleno de *buffer* de electroforesis,

colocando el lado marcado hacia el ánodo y asegurando una correcta alineación y se realizó una incubación de 40 minutos. Después, se llevó a cabo la electroforesis durante 20 minutos. El voltaje se calculó a través de la medición de la distancia entre los dos electrodos de la cubeta, considerando 1 V/cm. Cuando finalizó, se retiraron los portaobjetos de la cubeta y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con ddH₂O. Finalmente, se deshidrataron en etanol 100% durante 10 minutos dos veces. Los portaobjetos se dejaron secar durante toda la noche, en este punto ya a temperatura ambiente.

De manera previa al análisis, se marcaron las muestras con *SYBR Gold Nucleic acid gel stain* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), una tinción fluorescente que permite la detección del DNA. Para ello, se preparó una solución de trabajo al 0,8X en *buffer* Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA en ddH₂O, pH 7,5). Se realizó una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con esta solución, seguida de dos lavados de 5 minutos con ddH₂O. Las muestras se dejaron secar en oscuridad.

La detección de fluorescencia y la captura de imágenes se llevó a cabo con el microscopio THUNDER (Leica Microsystems), con un objetivo de 10X y manteniendo fijas las condiciones de captura (tiempo de exposición y FIM) para todas las condiciones del mismo experimento. Se capturaron al menos 80 campos para cada uno de los duplicados de cada condición.

El análisis de datos se realizó con el software CometScore 2.0, que identifica los cometas resultantes de la migración del DNA durante la electroforesis y calcula el porcentaje de DNA en la cola (medida que refleja el porcentaje de daño). En aquellas células que no presentan daño en el DNA se observa una elevada compactación, de tal manera que casi la totalidad del DNA se encuentra en la cabeza. Sin embargo, cuanto mayor es el daño, mayor será el porcentaje de DNA en la cola. Para el control positivo, este porcentaje osciló siempre entre el 70 y el 90%. Se analizaron al menos 200 cometas por condición. Se realizaron tres réplicas independientes de este experimento.

12. Técnicas de manipulación de los ácidos nucleicos

A continuación, se describen las técnicas de manipulación de DNA y RNA empleadas en este trabajo.

12.1. Extracción de DNA a partir de tejido tumoral parafinado

Para extraer DNA a partir de muestras de tejido tumoral procedente de biopsias de pacientes, se realizaron 3-4 cortes de 10 μm de los bloques de tejido fijado en formalina e impregnado en parafina (FFPE). A continuación, se realizó el aislamiento de DNA genómico empleando el kit comercial *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* (Qiagen). Los pasos principales se resumen en la **Figura 30**.

En primer lugar, para eliminar la parafina, se añadió 1 ml de xileno por muestra y se incubaron durante 30 minutos a 70°C, agitando las muestras cada 10 minutos con un vórtex. Después, se realizó una centrifugación a 10000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. A continuación, se realizaron al menos tres lavados con etanol absoluto para eliminar los restos de xileno.

Posteriormente, se siguieron los pasos del kit comercial. Se añadieron 180 μl de tampón ATL y 20 μl de proteinasa K por muestra y se realizó una incubación a 90°C durante 1 hora. Tras este tiempo, se añadieron 200 μl de tampón AL y 200 μl de etanol absoluto por muestra y se transfirió la mezcla a la columna QIAamp MinElute.

Se realizó una centrifugación a 6000 rcf durante 1 minuto para que el DNA se uniese a la columna. Se realizaron dos lavados con 500 μl del tampón AW1 y otro lavado adicional con 500 μl de tampón AW2. Finalmente, se añadieron 40 μl de ddH₂O (agua bidestilada estéril) para eluir la muestra mediante centrifugación.

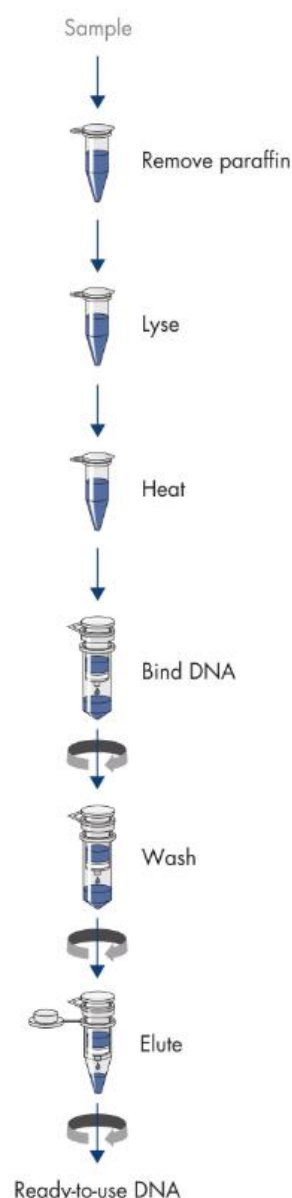


Figura 30. Procedimiento de aislamiento de DNA genómico a partir de tejido tumoral parafinado.

12.2. Extracción de DNA a partir de líneas celulares

Para extraer DNA a partir de líneas celulares de CECC se partió células en cultivo creciendo en monocapa en placas de 10 cm de diámetro al 80% de confluencia (aproximadamente 8 millones de células). Para ello, tras realizar dos lavados con PBS 1X Na/K, se despegaron las células de la placa añadiendo con el agente de disociación TrypLE Express 1X. Tras 5 minutos de incubación a 37°C, se recogieron las células añadiendo medio de cultivo RPMI 1640 1X con L-glutamina suplementado con un 10%

de FBS inactivado y un 1% de penicilina/estreptomicina y se pasaron a un tubo de 15 ml. Se realizó una centrifugación a 800 rpm durante 5 minutos y el botón celular se lavó de nuevo con PBS 1X Na/K. Posteriormente, el botón celular se resuspendió en tampón Fornace (0,25 M sacarosa, 5 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂) y se centrifugó a 1500 rpm y 4°C durante 10 minutos.

A continuación, se resuspendieron las células en una solución compuesta por: tampón Fornace, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) 10 mM pH 8,0 para posibilitar la inactivación de nucleasas, 50 µg/mL de proteinasa K (ApliChem) para la degradación de las proteínas y SDS (dodecilsulfato sódico) al 1%, para romper la membrana celular. Esta mezcla se incubó durante 16 horas a 55°C. Tras este paso, se procedió a purificar el DNA. Para ello, se añadió una solución de fenol tamponado a pH 8,0 y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 24:1) en proporción 1:1 en volumen y se realizó una centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos. Esto permitió separar la fase orgánica de la fase acuosa. Se recogió la fase acuosa, donde se encuentra el DNA, y se añadió CIAA en proporción 1:1 en volumen. Se repitió la centrifugación anterior y se recogió de nuevo la fase acuosa. Se añadió etanol absoluto frío para precipitar el DNA, se recogió y se realizó un lavado con etanol al 70% para eliminar sales y restos proteicos. Finalmente, se resuspendió el DNA en 100 µl de ddH₂O estéril. Las muestras de DNA se conservaron a -20°C.

12.3. Extracción de RNA a partir de líneas celulares

Para extraer RNA a partir de líneas celulares se procedió del mismo modo que para la extracción de DNA hasta la obtención del botón celular. En este caso, también se partió de células en cultivo en placas de 10 cm de diámetro al 80% de confluencia. Después de lavar el botón celular con PBS 1X Na/K, este se resuspendió en 1 ml de reactivo TRIzol™ (Life Technologies), una solución monofásica de isotiocianato de fenol y guanidina que permite el aislamiento de RNA total de alta calidad. Se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa del complejo nucleoproteico. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo, se homogenizó la mezcla con vórtex y se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se centrifugó la muestra durante 15 minutos a 12000 rcf y 4°C. Se separó la fase acuosa a un nuevo tubo para proceder a aislar el RNA. Se añadieron 500 µl de isopropanol y se realizó una incubación de 10 minutos a 4°C. A continuación, se centrifugaron las muestras durante 10 minutos a 12000 rcf y 4°C para precipitar el RNA total. Se realizó un lavado con 1 ml de etanol al 70% y, finalmente, se resuspendió el

pellet de RNA en 30 µl de agua libre de enzimas RNasas. Las muestras de RNA se conservaron a -80°C.

12.4. Cuantificación de ácidos nucleicos

La concentración de DNA y RNA aislado a partir de líneas celulares se determinó por espectrofotometría con el aparato *NanoDrop® 2000* (Thermo Fisher Scientific) midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm. Además, se determinó el grado de pureza de las muestras mediante los ratios de absorbancia A260/A280 y A260/A230. En el caso del cociente A260/A280, se consideró aceptable el rango 1,7-2,0 para el DNA y el rango 1,9-2,2 para el RNA. En el caso del cociente A260/A230, que indica la presencia de compuestos orgánicos, se consideraron aceptables valores del rango 2,0-2,2 tanto para DNA como para RNA.

En cuanto a la concentración del DNA extraído a partir de tejido tumoral parafinado, esta se midió por fluorimetría con el aparato *Qubit® 3.0* (Life Technologies). Este método presenta una mayor especificidad que la espectrofotometría, especialmente importante al manipular muestras que, por su origen, tienen más probabilidad de contener DNA o RNA fragmentado.

12.5. Síntesis de DNA complementario mediante transcripción reversa

Para poder realizar estudios de expresión génica, dada la inestabilidad de la molécula del RNA, se realizó un paso previo de síntesis del DNA complementario (cDNA). Para ello, se partió del RNA mensajero (mRNA), que se puede retro-transcribir a cDNA, una molécula mucho más estable, mediante una reacción de transcripción reversa (RT) llevada a cabo por la enzima transcriptasa reversa, también conocida como retrotranscriptasa.

Para sintetizar el cDNA se empleó el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems™). En primer lugar, se diluyó 1 µg de RNA total en H₂O libre de nucleasas en un volumen final de 10 µl. A esta muestra se le añadió una mezcla de volumen final de 10 µl compuesta por: 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix (100 mM), 2 µl de 10X RT Random Primers, 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 1 µl de RNase Inhibitor y 3,2 µl de H₂O libre de nucleasas. La reacción se preparó en hielo y, después, se programó un termociclador para llevar a cabo la reacción de síntesis de cDNA en las condiciones que se resumen en la **Tabla 11**. El

cDNA obtenido se cuantificó por espectrofotometría en el aparato *NanoDrop® 2000* tal y como ha sido descrito previamente.

Tabla 11. Pasos de la síntesis de cDNA mediante RT.

Paso	1	2	3	4
Temperatura	25°C	37°C	85°C	4°C
Tiempo	10'	120'	5'	Mantener

12.6. Amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR

A partir del DNA extraído a partir de distintas líneas celulares se amplificaron fragmentos de interés mediante PCR (*polymerase chain reaction*). En concreto se amplificó el exón 10 de la variante 1 de del gen *ATG7* (NM_006395.3). Para preparar la reacción de PCR se emplearon los siguientes reactivos y cantidades: 7,5 µl del reactivo comercial PCR Master Mix 2X (Promega) (compuesto por 22 mM Tris-HCl a PH 8,4, 55 mM KCl, 1,65 mM de MgCl₂, 220 µM de dNTP y 22 unidades de Taq DNA polimerasa), 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos a 10 µM (en sentido directo o *forward* y en sentido inverso *reverse*), 4,5 µl de H₂O libre de nucleasas y 1 µl de muestra de DNA genómico total a una de concentración de 50 ng/µl. Además, se preparó un control negativo con todos los componentes de la reacción a excepción del DNA.

Los oligonucleótidos empleados se diseñaron para hibridar de manera específica con la región de interés empleando la herramienta virtual Primer-BLAST (National Institutes of Health, NIH) (**Tabla 12**).

Tabla 12. Oligonucleótidos empleados en la amplificación del fragmento de interés del gen *ATG7* mediante PCR.

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Tamaño del amplicón
<i>ATG7</i> Exón 10	5' AACCAGAAAGGAGGCATGGG 3'	5' GTAACACACGGCAGCATGAC 3'	189 pb

Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador (Invitrogen™, Life Technologies) utilizando un programa de PCR convencional con una temperatura de anillamiento de 58°C, que se optimizó para los oligonucleótidos empleados. De este modo, las muestras se desnaturalizaron durante 5 minutos a 95°C

y seguidamente se programaron 40 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 95°C 30 segundos, el anillamiento de los oligonucleótidos a 58°C 30 segundos y la extensión y síntesis de nuevos fragmentos a 72°C 30 segundos, tras los que se llevó a cabo un paso de extensión adicional a 72°C 10 minutos.

12.7. Electroforesis en gel de agarosa

Tras la amplificación de los fragmentos de DNA de interés, estos se separaron por su tamaño molecular mediante una electroforesis horizontal en un gel al 2% de agarosa en tampón TBE 0,5X X (Tris 0,045 M, ácido bórico 0,045 M, EDTA 1,0 mM, pH 8,0). Al gel de agarosa se incorporó el reactivo SYBR® *Safe DNA Gel Stain* en una concentración 1:10000 (Invitrogen™, Life Technologies). Este es un agente que se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA y emite fluorescencia tras la exposición a luz ultravioleta (254 nm), por lo que permite la visualización del DNA.

Para comprobar que el tamaño de los fragmentos amplificados era el esperado, se empleó un marcador de peso molecular derivado del DNA del fago ΦX-174 cortado con la endonucleasa HaeIII, que genera amplicones con los siguientes tamaños: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118 y 72 pb (pares de bases). Antes de cargar las muestras en el gel, se les añadió un tampón de carga que contiene glicerol, que aporta densidad, azul de bromofenol, que actúa como marcador del frente de la electroforesis, y un tampón para estabilizar el pH. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 120 V durante 40 minutos. Finalmente, se visualizaron los fragmentos de DNA amplificado y se comprobó el correcto funcionamiento de la reacción de PCR.

12.8. Purificación de productos de PCR

La purificación de los fragmentos de DNA amplificados mediante PCR, para eliminar impurezas y restos de otros componentes empleados en la reacción, se realizó con el kit comercial *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para ello, se procedió mezclando el producto de PCR con un *binding buffer* en proporción 1:1. Este tampón permite la unión del DNA a la membrana de las columnas comerciales que incluye el kit. De este modo, el siguiente paso fue pasar la mezcla a estas columnas y realizar una centrifugación a 14000 rpm durante 2 minutos. Después, se añadieron 500 µl a cada muestra de la solución *wash buffer*, un tampón de lavado y se repitió la centrifugación anterior. Antes de proseguir, se realizó una centrifugación adicional para

secar la columna. Por último, el DNA adherido a la membrana se eluyó en 20 µl de la solución *elution buffer* tras centrifugar de nuevo en las mismas condiciones.

12.9. Secuenciación automática por el método de Sanger

Para la secuenciación automática, se emplearon un total de 5-10 ng de DNA purificado con 3 pmol del oligonucleótido “forward” o “reverse” correspondiente en un volumen final de 8 µl, completado con ddH₂O estéril. Para la reacción de secuenciación Sanger se utilizó el kit comercial BigDye Terminator® v.3.1. Este procedimiento se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación del ADN de la Universidad de Salamanca, donde se empleó un secuenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific).

La lectura de secuencias se realizó empleando los programas Chromas lite 2.01 y SnapGene® Viewer v.5.2. La determinación del grado de homología con las secuencias de referencia, obtenidas desde la herramienta en línea *Genome Browser* de la Universidad de California²⁶⁶, se realizó con el programa Serial Cloner.

12.10. PCR cuantitativa comparativa

La PCR cuantitativa (q-PCR) es un tipo de PCR que permite amplificar y cuantificar de manera simultánea y a tiempo real un determinado fragmento de DNA o de cDNA, refiriéndonos a RT-qPCR en este último caso. Esta técnica se fundamenta en el acoplamiento de un termociclador y un fluorímetro, que permite detectar la fluorescencia emitida por sondas fluorescentes o por componentes intercalantes unidos al DNA. De este modo, la monitorización de la fluorescencia a lo largo de la reacción de PCR permite identificar tanto ganancias y pérdidas de material genético como alteraciones en la expresión, a través de la comparación con una muestra de referencia.

La cuantificación se realiza a través de distintos parámetros. El ciclo umbral (Ct) indica el número de ciclos de amplificación necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia diferencial (ΔR_n) respecto a la señal base de emisión y que es directamente proporcional a la cantidad inicial de DNA molde de partida. A partir de este ciclo, comienza a detectarse la amplificación de nuestro fragmento de interés, generándose una curva de amplificación que se estabiliza conforme avanzan los ciclos, indicando la finalización de la reacción (**Figura 31**).

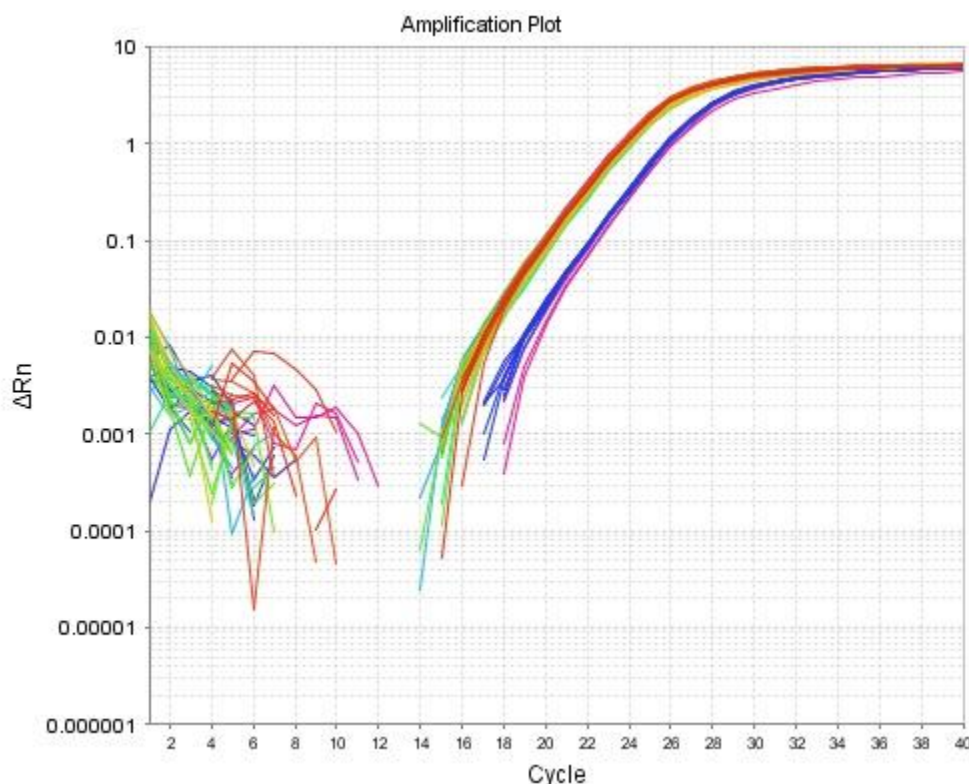


Figura 31. Curva de amplificación de DNA en la que se representa el aumento de fluorescencia diferencial a lo largo de los distintos ciclos de la reacción de PCR. Cada color representa la amplificación de un gen determinado en una muestra concreta con cuatro réplicas. Se pueden observar diferencias en el Ct entre las distintas reacciones de amplificación.

Por otra parte, la temperatura de fusión (T_m) es otro parámetro importante, que refleja la especificidad de la reacción. La T_m es la temperatura a la cual se ha desnaturalizado el 50% del DNA genómico y se representa en una curva de temperaturas, llamada *melt curve* o curva de fusión. Esta se genera al finalizar la etapa de extensión de la qPCR y permite determinar si se ha generado un único amplicón, específico, o varios, lo cual es indicativo de que los oligonucleótidos han anillado de manera inespecífica en otros fragmentos del DNA y el resultado no es fiable. De este modo, en la curva de fusión se debe distinguir un único pico, tal y como se muestra en la **Figura 32**.

Para obtener un resultado comparativo, es necesario emplear una muestra control. En el caso de la qPCR basada en DNA, esta se trata de una muestra con un número conocido de copias del gen de interés. En el caso de la RT-qPCR basada en RNA, en la que el material de partida es cDNA, esta es una muestra de referencia respecto a la cual queremos analizar variaciones en los niveles de expresión génica. Así, es necesario amplificar de manera simultánea y en el mismo equipo las muestras de interés y la muestra control. Asimismo, además de amplificar fragmentos de genes de interés, es

necesario amplificar un fragmento de un gen que funciona como un control endógeno, que no presenta cambios en las condiciones del estudio y que se emplea para normalizar la cantidad de DNA o cDNA de partida. En el caso de la amplificación de DNA se empleó como control endógeno el gen *LEMD3* y en el caso de la amplificación de cDNA el gen *GAPDH*. El uso de estos genes como controles endógenos está estandarizado.

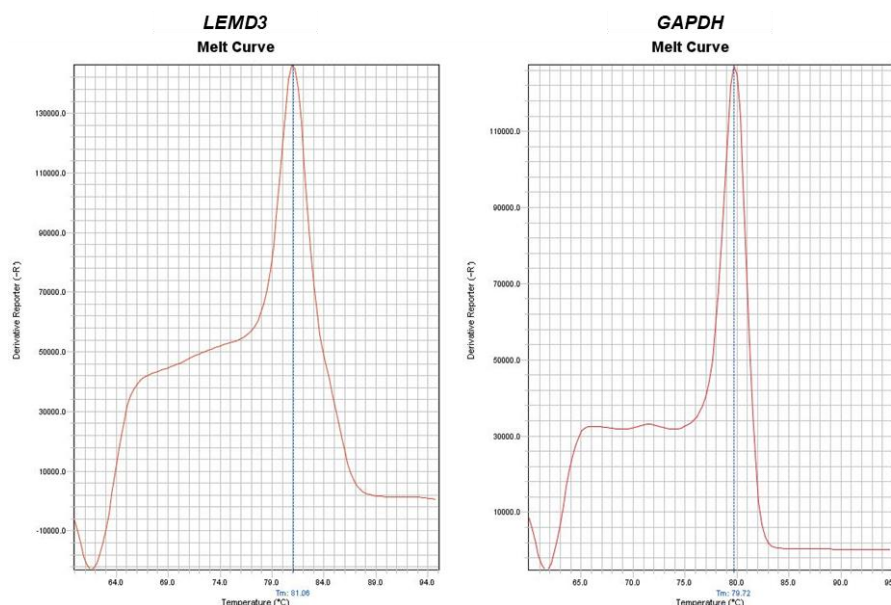


Figura 32. Curva de fusión de los productos de amplificación de los controles endógenos empleados en la PCR cuantitativa comparativa, *LEMD3* y *GAPDH*.

Para obtener un resultado comparativo, es necesario emplear una muestra control. En el caso de la qPCR basada en DNA, esta se trata de una muestra con un número conocido de copias del gen de interés. En el caso de la RT-qPCR basada en RNA, en la que el material de partida es cDNA, esta es una muestra de referencia respecto a la cual queremos analizar variaciones en los niveles de expresión génica. Así, es necesario amplificar de manera simultánea y en el mismo equipo las muestras de interés y la muestra control. Asimismo, además de amplificar fragmentos de genes de interés, es necesario amplificar un fragmento de un gen que funciona como un control endógeno, que no presenta cambios en las condiciones del estudio y que se emplea para normalizar la cantidad de DNA o cDNA de partida. En el caso de la amplificación de DNA se empleó como control endógeno el gen *LEMD3* y en el caso de la amplificación de cDNA el gen *GAPDH*. El uso de estos genes como controles endógenos está estandarizado.

De este modo, se empleó el método de cuantificación relativa que se basa en el parámetro $\Delta\Delta C_t$, mediante la cual se determina la proporción de expresión o abundancia del gen específico en la muestra, en comparación con un gen control, y se normaliza con la proporción de expresión de un gen de referencia.

Se diseñaron distintos oligonucleótidos para hibridar de manera específica con distintos genes de interés empleando la herramienta virtual Primer-BLAST, cuya secuencia y características se recogen en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos de genes de interés mediante qPCR o RT-qPCR.

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Tamaño del amplicón
LEMD3 Exón 1	5' GCGGCTGCCGGGAGTCTAGACAG 3'	5' GGTAGGTATGATTGGAGCCCG 3'	343 pb
ATG7 Exón 10	5' AACAGGATGGTGAACCTCAGTGAC 3'	5' GTAACACACGGCAGCATGAC 3'	165 pb
GAPDH cDNA	5' GAGAAGGCTGGGGCTCATTT 3'	5' TGAGTCCTTCCACGATACCA 3'	208 pb
ABCB1 cDNA	5' CACAGAGGGGATGGTCAGTG 3'	5' GCATTGGCTTCCTTGACAGC 3'	189 pb
DNAJC15 cDNA	5' AGCTGTAGGACTGGGTGTTG 3'	5' CCAGCAGATGGGCTTACACC 3'	201 pb
CYCS cDNA	5' GCCACACCGTTGAAAAGGGA 3'	5' TTGGCGGCTGTGTAAGAGTAT 3'	106 pb
TUBB3 cDNA	5' GTGGATCCCCAACAACGTGA 3'	5' GTCTTCGTACATCTCGCCCTC 3'	289 pb
ATG7 cDNA	5' GTCATCAATGCTGCTTTGGGAT 3'	5' CAGCCAAGCTTGTAACCAGG 3'	167 pb
SQSTM1 cDNA	5' CCGAGTGTGAATTCCTGAAG 3'	5' GATGGGTCCAGTCATCATCTC 3'	328 pb
NFkB1 cDNA	5' AAGGACCCTGAAGTTGTGA 3'	5' CCTGAACTCCAGCACTCTCTTC 3'	172 pb

Como paso previo a la realización de la PCR cuantitativa comparativa se cuantificaron las muestras de DNA y cDNA por espectrofotometría y se prepararon alícuotas a una concentración de 20 ng/μl. Para cada reacción de PCR se mezclaron los siguientes componentes: 5 μL de SYBR® Green PCR Master Mix (Roche), que contiene, además de los reactivos necesarios para la amplificación (dNTPs, DNA

polimerasa termoestable y un tampón adecuado) un agente intercalante fluorescente, 0,5 µl de cada oligonucleótido (*forward* y *reverse*) a 10 µM, 2 µl de H₂O libre de nucleasas y 2 µl de DNA o cDNA a 20 ng/µl de la muestra correspondiente. Se preparó también un control negativo para cada gen a amplificar al que no se le añadió DNA. Todas las reacciones de PCR cuantitativa comparativa se llevaron a cabo en placas ópticas de 96 pocillos *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0.1 ml* (Invitrogen™, Life Technologies) cubiertas con láminas ópticas transparentes *MicroAmp® Optical Adhesive Film* (Invitrogen™, Life Technologies). Se prepararon 4 réplicas para cada condición con el fin de garantizar la fiabilidad del resultado.

Para realizar la qPCR o RT-qPCR se utilizó el equipo *StepOnePlus™ Real-Time PCR System* (Invitrogen™, Life Technologies), compuesto por un termociclador acoplado a un fluorímetro y conectado a un ordenador con el programa *StepOne software v.2.1* (Invitrogen™, Life Technologies), desde el que se configuró el experimento y se analizaron los resultados. Las condiciones del programa de amplificación se muestran en la **Tabla 14**.

Tabla 14. Programa de amplificación empleado para llevar a cabo la PCR cuantitativa comparativa.

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Holding stage	95°C	10'	1
Cycling stage	95	15''	40
	60	1'	
Melt curve stage	95°C	15''	1
	60	1'	
	+ 0,3°C	-	
	95	15	

12.11. Arrays de hibridación genómica comparada

Para identificar pérdidas y ganancias de material genómico tanto en líneas celulares como en muestras tumorales procedentes de pacientes se emplearon los *arrays* de hibridación genómica comparada (aCGH). Estos estudios se realizaron en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC de Salamanca. Los *arrays* genómicos están compuestos por una colección de sondas de DNA dispuestas sobre un soporte sólido que permiten detectar alteraciones en el genoma. En concreto, los aCGH se basan en la comparación de la hibridación con estas sondas de una muestra

de DNA control y la muestra en estudio. Se trata de una buena herramienta para caracterizar alteraciones citogenéticas. La muestra primaria empleada puede tener diversos orígenes y los avances de la técnica en los últimos años han permitido reducir tanto la cantidad de DNA necesaria como el coste del procedimiento.

En la **Figura 33** se resume el procedimiento en el que se basa la técnica de aCGH. De forma resumida, consiste en marcar las muestras de DNA genómico con distintos fluoróforos, la hibridación de las muestras de DNA con las sondas en el *array*, realizar una serie de lavados y, finalmente, analizar los datos de fluorescencia.

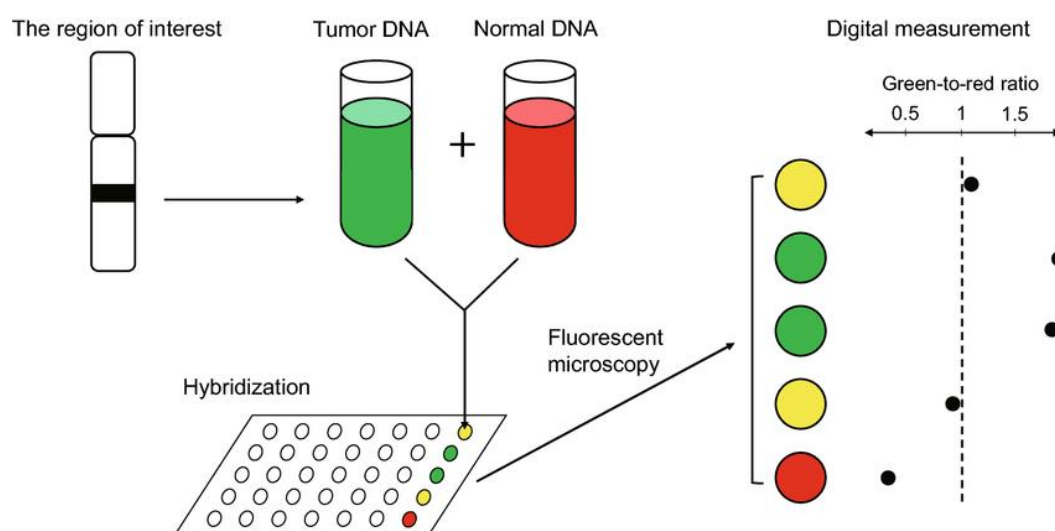


Figura 33. Fundamento de la técnica de aCGH para la detección de ganancias y pérdidas de material genómico. Obtenido de Lee J. *et al.*, 2022²⁶⁷.

En el caso de las muestras de pacientes, se emplearon 80 ng de DNA genómico, extraído a partir de tejido tumoral paraafinado y cuantificado por fluorimetría. Se llevó a cabo el *OncoScan™ CNV FFPE Assay* (Affymetrix, Thermo Fisher Scientific) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Este ensayo se basa en la tecnología de sonda de inversión molecular (MIP) y permite la detección de CNA y pérdida de heterocigosidad (LOH) a lo largo de todo el genoma en tumores sólidos a partir pequeñas cantidades de DNA y cierto grado de degradación, habitual en los bloques FFPE. Además, cuenta con una buena resolución para el número de copias, 50-100 kb en 900 genes asociados a cáncer y 300 kb en el resto del genoma. Se analizaron mediante este procedimiento 177 muestras de tejido tumoral.

En el caso de la caracterización mediante aCGH de líneas celulares se empleó el *CytoScan™ HD Assay* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo el protocolo del fabricante. Este ensayo proporciona una cobertura muy amplia y un alto rendimiento para detectar aberraciones cromosómicas. La sensibilidad es superior al 99% y es posible detectar

con una elevada fiabilidad CNA de 25-50 kb en todo el genoma, con una especificidad muy alta. El material empleado fue: CytoScan™ Reagent kit (Thermo Fisher Scientific), CytoScan™ Amplification kit (Thermo Fisher Scientific) y CytoScan™ HD Array (Thermo Fisher Scientific). En cuanto al equipo empleado, consistió en el sistema integrado de análisis de *microarrays* de GeneChip® de Affymetrix, incluyendo GeneChip® Hybridization Oven 645, GeneChip® Fluidics Station 450 y GeneChip® Scanner 3000 7G System.

En ambos casos, el software de análisis fue *Chromosome Analysis Suite 3.3* (ChAS). Además, se empleó el algoritmo *Identification of Significant Targets in Cancer* (GISTIC) para identificar las CNA con significado biológico en las muestras estudiadas.

12.12. Estudio del transcriptoma mediante *microarrays* de expresión

El análisis del transcriptoma se llevó a cabo mediante *microarrays* de expresión con el *Clariom™ S Assay* (Thermo Fisher Scientific) en la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer-IBMCC de Salamanca. Se realizó a partir de RNA de distintas líneas celulares para detectar cambios en los perfiles de expresión génica. La base de la técnica es muy similar a la de los aCGH.

Para llevar a cabo este estudio, las muestras de RNA extraídas se purificaron con el kit *RNeasy® Mini Kit* (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. Después, se realizó la cuantificación de la concentración de las muestras por espectrofotometría para preparar posteriormente alícuotas de al menos 100 ng.

A continuación, se evaluó la integridad del RNA utilizando el bioanalizador *Agilent 2100* (Agilent Technologies). Posteriormente, se llevó a cabo el *Clariom™ S Assay* siguiendo las instrucciones del fabricante. El primer paso fue la preparación de las muestras de RNA en el que se llevó a cabo la transcripción reversa, la amplificación, la fragmentación y el marcaje con el GeneChip® WT PLUS Reagent Kit (Applied Biosystems). Después, las moléculas de cDNA marcadas se hibridaron con las sondas en los *Clariom™ S Arrays*. Para el lavado y escaneo de las muestras, al igual que en el caso de los aCGH, se utilizó el sistema integrado de análisis de *microarrays* de GeneChip® de Affymetrix (*GeneChip® Hybridization Oven 645*, *GeneChip® Fluidics Station 450* y *GeneChip® Scanner 7G*). La cantidad de señal fluorescente detectada en el escaneado refleja el nivel de hibridación a una sonda determinada, que es proporcional al número de fragmentos de ácidos nucleicos complementarios en las muestras. Finalmente, se llevó a cabo el análisis de los resultados obtenidos. Se realizó

una normalización de los datos por cuantiles, una corrección del fondo y una transformación en log2 mediante el procedimiento *Robust Multiarray Average* (RMA). Las diferencias de expresión entre las distintas muestras se determinaron con el paquete *limma* (v.3.46.0) de Bioconductor. Se empleó el parámetro *fold change* (FC) para establecer las alteraciones diferenciales significativas, considerando un FC igual o superior a 1,5 como sobreexpresión y un FC igual o inferior a -1,5 como infraexpresión.

13. Técnicas de manipulación y análisis de proteínas

A lo largo de este trabajo, se realizó el análisis de la expresión de proteínas mediante distintas técnicas: *western blot*, inmunofluorescencia y estudio del proteoma mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-IMS/MS). Para ello, se realizó extracción y cuantificación de proteínas a partir de las distintas líneas celulares de CECC y de la fracción de EVs de 100K, por presentar una mayor abundancia.

13.1. Extracción de proteínas a partir de líneas celulares

Para llevar a cabo la extracción de proteína total a partir de líneas celulares, se partió de células en cultivo en placas P100 con un 80% de confluencia. Estas células se lavaron con PBS 1X Na/K y, posteriormente, se añadieron 500 µl de *buffer* de lisis por placa, compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100, un cóctel de inhibidores de proteasas (*cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) y un cóctel de inhibidores de fosfatasa (*PhosSTOP™*, Roche), diluidos según las indicaciones del fabricante. Las células se recogieron con un *scraper* o rascador y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml, que se mantuvo a 4°C y en agitación durante 45 minutos. Pasado este tiempo, se realizó una centrifugación a 13000 rpm y 4°C durante 15 minutos, para precipitar los restos celulares. El sobrenadante, con las proteínas, se transfirió a un nuevo tubo. Se realizó la cuantificación proteica y las muestras se conservaron a -80°C. La extracción de proteínas para cada línea celular se realizó por triplicado.

13.2. Cuantificación proteica por el método de Bradford

Para cuantificar la concentración proteica tanto de las muestras procedentes de líneas celulares como de las muestras de EVs se empleó el método de Bradford, una técnica colorimétrica que se basa en el cambio diferencial de color del colorante azul

brillante G-250 Coomassie ante distintas concentraciones de proteína. En el caso de las EVs no fue necesario realizar un paso previo de extracción. Para la cuantificación se empleó el reactivo comercial *Bio-Rad Protein Assay* (Bio-Rad) y se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas y crecientes de albúmina sérica bovina (BSA) (0-750 µg/ml). Se realizó una dilución 1:10 de los extractos proteicos de interés. Finalmente, se midió la absorbancia a 595 nm empleando el lector de microplacas *Infinite M200* (Tecan®), que presenta una relación directa con la cantidad de proteína presente en la muestra.

13.3. *Western blot*

Una de las técnicas empleadas para comparar los niveles de expresión de determinadas proteínas entre las distintas líneas celulares y también entre las EVs aisladas a partir de las células CAL33 y CAL33-R fue el *western blot*. En el caso de las EVs, además de utilizar esta técnica para analizar la expresión de proteínas de interés, se empleó para detectar marcadores proteicos establecidos por las guías internacionales, *Minimal information for studies of extracellular vesicles* (MISEV) 2023, para completar su caracterización (**Tabla 15**).

En primer lugar, se prepararon muestras de todos los extractos proteicos con 30 µg de proteína en un volumen final de 30 µl con 5 µl de tampón de carga 6X (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, 20% glicerol, 4% SDS, 0,05% azul de bromofenol y 2% β-mercaptoetanol). Después, se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos en un termobloque, para que las proteínas perdiesen su estructura terciaria y cuaternaria.

Tras la preparación de las muestras, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Para ello, se prepararon los geles, que están compuestos por dos fases. El gel separador, en la parte inferior, se preparó con distinto porcentaje de acrilamida en función del tamaño de las proteínas de interés (8-12% de una solución de acrilamida: bis-acrilamida 29:1 al 30%) en un *buffer* con Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 y SDS al 10%. Sin embargo, el gel concentrador, en la parte superior, se preparó con un porcentaje de acrilamida constante al 4% en un *buffer* con Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y SDS al 10%. Para la polimerización de los geles se incorporó tetrametiletilendiamina (TEMED) y persulfato de amonio (APS). Junto con las muestras, en cada uno de los geles se cargó el marcador de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus* (Thermo Fisher Scientific), una mezcla de proteínas marcadas en azul, rojo y verde, de los siguientes tamaños: 250, 130, 100, 70, 55, 35, 25, 15, 10 kDa. La electroforesis vertical se realizó a voltaje constante, a 75V los

primeros 30 minutos y a 150V durante aproximadamente 1 hora, empleando un buffer compuesto por Tris 20 mM, glicina 192 mM y SDS al 1%.

Tabla 15. Criterios para la caracterización de EVs basada en el contenido proteico (MISEV 2023).
Obtenida de Welsh *et. al*, 2024¹⁹⁸.

Category				
1- Transmembrane (or GPI-anchored) proteins associated with plasma membrane and/or endosomes All EVs Non-exhaustive examples, categorized a, b, c: by decreasing strength of membrane association.	2- Cytosolic proteins in EVs All EVs	3- Major components of non-EV co-isolated structures (NVEPs) All EVs as purity control	4- Transmembrane, lipid-bound and soluble proteins associated with intracellular compartments other than PM/endosomes Subtypes of EVs and/or pathologic/atypical state, and/or novel separation method	5- Secreted proteins recovered with EVs Corona or functional component of EVs
1a: multi-pass transmembrane proteins. Tetraspanins (CD9, CD63, CD81, CD82); other multi-pass membrane proteins (CD47; heterotrimeric G proteins GNA*, TSAP6)	2a: with lipid or membrane protein-binding ability. ESCRT-I/II/III (TSG101, CHMP*) and accessory proteins: ALIX (PDCD6IP), VPS4A/B; ARRDCl; Flotillins (FLOT1/2); caveolins (CAV*); syntenin (SDCBP)	3a: lipoproteins. Produced mostly by liver, abundant in plasma, serum. Apolipoproteins	4a: nucleus. Histones (HIST1H**); Lamin A/C (LMNA/C)	5a: blood-derived corona proteins. Partially overlapping with 3a/3b: apolipoproteins, complement, fibrinogen
1b: single-pass transmembrane proteins. Major Histocompatibility Class I or II, Integrins (ITGA*/ITGB*), transferrin receptor (TFR2); LAMP1/2; heparan sulphate proteoglycans including syndecans (SDC*); EMMPRIN (BSG); ADAM10	2b: promiscuous incorporation into EVs (and possibly NVEPs). Heat shock proteins HSC70 (HSPA8), and HSP84 (HSP90AB1) note that both are abundant also in NVEPs; cytoskeleton: actin (ACT*), tubulin (TUB*); enzymes (GAPDH)	3b: protein and protein/nucleic acid aggregates. Immunoglobulins (blood); Tamm-Horsfall protein (Uromodulin/UMOD; urine); albumin. YWAH* (14-3-3*) and AGO* (can be present in EVs but generally more abundant in NVEPs).	4b: mitochondria. VDAC, cytochrome C (CYC1); TOMM20	5b: cytokines and growth factors. e.g., TGFBI/2; IFNG, VEGFA, FGF1/2, PDGF*, EGF, interleukins (IL*)
1c: GPI- or lipid-anchored proteins. Glypicans (GPC1), 5' nucleotidase CD73 (NTSE), complement-binding protein CD59		3c: exomere or supermere-enriched components. HSP90AA/B, TGFBI, HSPA13, LDHA/B	4c: secretory pathway. Endoplasmic reticulum, Golgi apparatus: calnexin (CANX); Grp94 (HSP90B1); BIP (HSPA5), GM130 (GOLGA2)	5c: adhesion and extracellular matrix proteins. Fibronectin (FNI), Collagens (COL**), MFGE8; galectin3-binding protein (LGALS3BP), CD5L; fetuin-A (AHSG)
			4d: others. Autophagosomes, cytoskeleton... LC3 (MAP1LC3A), Actinin1/4 (ACTN1/4)	

At least one protein of categories 1, 2 and 3 should be analysed as EV hallmarks and to assess the presence of NVEPs in an EV preparation. Analysis of proteins of category 4 is optional, as they may be present in some subtypes of EVs, or under certain conditions, with no general rule. Proteins of category 5 may bind to EVs after their release and may be part of the recently described EV 'corona'. *Please note that this table provides a limited number of examples only* for proteins commonly found in mammalian cell-derived EVs. Other proteins that fall into the given categories may be equally valid, particularly for analysis of EVs from prokaryotic (bacteria) or non-mammalian eukaryotic sources (including parasites and plants). For most proteins of interest, their subcellular location in intracellular compartments (for categories 1 and 4), or their transmembrane or lipid-anchored nature (for categories 1 and 2), is provided in the Uniprot database (www.uniprot.org). XX* or XX** used for families of multiple proteins, for example, for integrins: ITGA* indicates any integrin alpha chain

A continuación, las proteínas separadas por tamaño se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck Milipore), previamente activadas con metanol y lavadas con ddH₂O. Para ello, se realizó una transferencia semi-seca con el equipo *Trans-Blot Turbo Transfer System* (BioRad), con un voltaje constante de 25V durante 30 minutos. Se empleó un *buffer* de transferencia compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 8,5, glicina 192 mM y 20% de metanol.

Posteriormente, como paso previo a la incubación con los distintos anticuerpos, se realizó un bloqueo con un 5% de leche o albúmina de suero bovino (BSA) en TBS-T (0,1% de Tween-20 en TBS), durante 1 hora, a temperatura ambiente, con las

membranas en rotación. Se empleó leche o BSA, tanto en el bloqueo como en la incubación con el anticuerpo primario, en función de la proteína a detectar, teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante para cada uno de los anticuerpos empleados.

El siguiente paso fue la incubación con los anticuerpos primarios, que se unen a las proteínas de interés, preparados a distintas concentraciones en TBS-T con un 5% m/v de leche o BSA, a 4°C durante toda la noche, con las membranas en rotación (**Tabla 16**). Tras esta incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos con TBS-T, a temperatura ambiente y con las membranas en rotación. Después, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP), durante 1 hora, a temperatura ambiente y en rotación. El anticuerpo secundario se une al anticuerpo primario y permite la visualización de la proteína. A continuación, se repitieron los 3 lavados.

Finalmente, se procedió al revelado de las membranas por quimioluminiscencia. Este se basa en la oxidación del luminol catalizada por la peroxidasa del anticuerpo secundario en presencia de peróxido de hidrógeno y en la exposición posterior durante un tiempo variable de las membranas a películas fotosensibles de autorradiografía (*Fuji Medical X-Ray Film*, Fujifilm), en las que se visualizan las proteínas. Se empleó una solución de revelado casera compuesta por 100 ml de Tris-HCl 1 M pH 9,35, 0,39 g de luminol (Sigma-Aldrich) y 0,475 g de 4-yodofenol (Sigma-Aldrich). A esta se le añadió H₂O₂ al 30% en ddH₂O en proporción 1:1000 en el momento del revelado.

Las mismas membranas se emplearon para la detección de distintas proteínas. En todos los casos, se empleó la β -Actina como control de carga. Para ello, fueron tratadas con una solución de *stripping* (10% de metanol y 10% de ácido acético en ddH₂O), que elimina los restos de anticuerpos. Se incubaron con esta solución durante 15 minutos a temperatura ambiente y en agitación y, posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T. Después, se procedió al bloqueo y a la reincubación con otros anticuerpos, tal y como ha sido descrito. Las membranas se conservaron a 4°C entre sus usos. Las películas fueron escaneadas para mostrar los resultados. Todas las proteínas fueron analizadas en los tres extractos proteicos procedentes de cada línea celular.

Tabla 16. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para el análisis de la expresión proteica mediante *western blot*.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Dilución	Tamaño (kDa)	Casa comercial
MDR1	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	130-180	Cell Signaling Technology 12683S
DNAJC15	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	16	ABCAM ab179820
ATG7	Primario	<i>Rabbit</i>	1:10000	78	ABCAM ab52472
ATG9A	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	100-110	Cell Signaling Technology 13509S
ATG5-ATG12	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	55	Cell Signaling Technology 2630S
ATG16L1	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	66	Cell Signaling Technology 8089S
p62	Primario	<i>Mouse</i>	1:2000	62	ABCAM ab56416
BECLIN1	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	52	Cell Signaling Technology 3738S
LC3C	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	17	ABCAM ab168813
LC3B	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	19 (LC3B-I) 17 (LC3B-II)	Novus Biologicals NB600-1384
α-Actinina-4	Primario	<i>Rabbit</i>	1:500	105	GeneTex GTX113116
ALIX	Primario	<i>Mouse</i>	1:200	95	Santa Cruz Biotechnology sc-53540
TSG101	Primario	<i>Mouse</i>	1:500	45	GeneTex GTX70255
CD9	Primario	<i>Rabbit</i>	1:1000	24	System Biosciences EXOAB-CD9A-1
β-Actina	Primario	<i>Mouse</i>	1:10000	42	Sigma-Aldrich A5441
Anti-Rabbit	Secundario	<i>Goat</i>	1:10000	N/A	ABCAM ab205718
Anti-Mouse	Secundario	<i>Goat</i>	1:10000	N/A	ABCAM ab205719

En algunos casos, se realizó una cuantificación relativa de los resultados empleando el programa Fiji (Fiji Is Just ImageJ) en su versión 2.9.0. Esta basa en la comparación por densitometría de las bandas observadas, realizando una normalización respecto a la proteína constitutiva β -Actina, que funciona como control de carga. Esta cuantificación permite el tratamiento estadístico de los datos.

13.4. Inmunofluorescencia

Para analizar la distribución celular y la expresión de proteínas de interés en las líneas celulares *knockout* para *ATG7* derivadas de la línea celular 32816 y en las líneas celulares control correspondientes, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia. Con este fin, se sembraron 300000 células por pocillo sobre cubreobjetos redondos de cristal de 12 mm de diámetro en placas de 6 pocillos. Al día siguiente, tras la adhesión de las células a los cristales, se comenzó el procesamiento de los mismos.

Tras lavar las células con PBS 1X Na/K, estas se fijaron a los cubreobjetos con una solución de paraformaldehído al 4% durante 10 minutos en hielo. Después, se realizaron tres lavados con PBS 1X Na/K de 5 minutos cada uno y, a continuación, se permeabilizaron las membranas celulares con Triton X-100 al 0,5% en PBS 1X Na/K, durante 10 minutos en hielo, para permitir la penetración de los anticuerpos en las células.

Posteriormente, se realizó un bloqueo con una solución de BSA al 10% en PBS 1X Na/K durante 90 minutos. Tras este tiempo, los cubreobjetos se colocaron en cámaras húmedas y se realizó la incubación simultánea de dos anticuerpos primarios en cada uno de ellos, diluidos en una solución de BSA al 3% en PBS 1X Na/K en un volumen final de 30 µl por cristal, durante 90 minutos a temperatura ambiente (**Tabla 17**). Siempre se combinó un anticuerpo producido en ratón con un anticuerpo producido en conejo. Después de una serie de lavados, se realizó la incubación con los anticuerpos secundarios diluidos en una solución de BSA al 1% en PBS 1X Na/K, durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Al finalizar esta incubación, se repitieron los lavados y se tiñeron los núcleos con una solución 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche) a una concentración de 0,5 µg/ml en ddH₂O, con una incubación de 5 minutos en oscuridad. El último paso fue el montaje de los cubreobjetos sobre portaobjetos empleando mowiol (Calbiochem). Los portaobjetos se conservaron a 4°C en oscuridad.

La visualización de las células y la captura de las imágenes se realizó mediante microscopía confocal con el equipo LEICA SP5 DMI-6000V (Leica Microsystems), acoplado a un ordenador con el software LEICA LAS AF, con un aumento de 63x. Las condiciones de captura se mantuvieron fijas para cada combinación de anticuerpos entre las distintas líneas celulares a comparar.

Tabla 17. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para la visualización y análisis de proteínas mediante inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Tipo	Origen	Dilución	Fluorescencia	Casa comercial
p62	Primario	<i>Mouse</i>	1:500	N/A	ABCCAM ab56416
p62	Primario	<i>Rabbit</i>	1:500	N/A	ABCCAM ab109012
ATG7	Primario	<i>Rabbit</i>	1:500	N/A	Cell Signaling Technology 13509S
LC3B	Primario	<i>Rabbit</i>	1:500	N/A	Novus Biologicals NB600-1384
LAMP-1	Primario	<i>Mouse</i>	1:100	N/A	Biolegend 328601
Anti-Mouse IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Secundario	<i>Goat</i>	1:1000	Verde	Invitrogen A21202
Anti-Rabbit IgG (H+L) Alexa Fluor 594	Secundario	<i>Donkey</i>	1:400	Rojo	Invitrogen A11037

13.5. Estudio del proteoma mediante cromatografía líquida acoplada espectrometría de masas

La comparación del contenido proteico de las células y de las EVs 100K de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R se llevó a cabo mediante un análisis de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-IMS/MS). Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con la Unidad de Proteómica incluida en el Servicio de Citometría del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca. En este estudio se partió de tres réplicas independientes de cada una de las muestras analizar. En el caso de las células, se partió de *pellets* celulares obtenidos en paralelo al aislamiento de EVs y conservados a -80°C, mientras que en el caso de las EVs se partió de una suspensión líquida de EVs en PBS 1X Na/K.

En primer lugar, las muestras se procesaron con el kit comercial iST Sample Preparation Kit (PreOmics®), que permite tanto la lisis y digestión celular para la extracción peptídica como la preparación de muestras para el equipo de LC-IMS/MS. Las muestras de EVs se procesaron del mismo modo para garantizar la fiabilidad del resultado comparativo.

Todas las muestras se lisaron añadiendo 50 µl de solución de lisis e incubando a 95°C durante 10 minutos en un termobloque con agitación (1000 rpm). Después, se añadieron 10 µl de solución de digestión por muestra y se realizó una incubación a 37°C

durante 90 minutos en un termobloque con agitación (500 rpm). Pasado este tiempo, se añadieron 100 µl de una solución para parar la reacción, incubando 1 minuto con una agitación de 500 rpm. A continuación, se transfirieron las muestras a cartuchos proporcionados por el kit y se centrifugaron a 3800 rcf durante 3 minutos. Se realizaron dos lavados, añadiendo 200 µl de las soluciones correspondientes y repitiendo las centrifugaciones. Tras esto, se añadieron 100 µl de solución de elución y se centrifugaron las muestras, recogiendo el volumen eluido en un nuevo tubo. Este paso se repitió, obteniendo un volumen final de 200 µl. Las muestras se colocaron en un evaporador de vacío a 45°C hasta que se secaron por completo. Finalmente, se añadieron 100 µl de buffer de carga para LC y se homogenizó la muestra mediante agitación a 500 rpm durante 5 minutos.

La concentración proteica se determinó mediante un ensayo de ácido bicinonínico (BCA) empleando el kit comercial *Pierce™ BCA Protein Assay Kits* (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva patrón con concentraciones conocidas y crecientes de BSA. Por último, se midió la absorbancia a 70 nm empleando el lector de microplacas *Infinite M200* (Tecan®), que presenta una relación directa con la cantidad de proteína presente en la muestra.

Para cargar las muestras en el equipo de LC-IMS/MS se usó el sistema Evotip Pure (Evosep), compuesto por columnas desechables de purificación y carga y adaptado al sistema robótico del equipo. Se partió de 200 ng de proteína y se siguió el protocolo del fabricante. Finalmente, se determinó el contenido proteico de las muestras con el equipo Evosep One-timsTOF Pro 2 (Bruker).

14. Análisis de enriquecimiento funcional

Tras la obtención de los genes y proteínas diferencialmente expresados entre las distintas líneas celulares o condiciones a comparar mediante *microarrays* de expresión y estudio del proteoma por LC-IMS/MS se realizaron varios análisis de enriquecimiento funcional empleando la herramienta *WebGestalt* (WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit). Esta herramienta incorpora tres métodos complementarios: análisis de sobrerrepresentación (ORA), el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes (GSEA) y el análisis basado en topología de red (NTA). Utiliza como fuentes bases de datos como KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), Reactome o Wikipathway, que contienen datos de rutas biológicas que describen la funcionalidad de los genes. De este modo, permite la identificación de rutas de señalización sobrerrepresentadas en un conjunto de genes. Esta herramienta proporciona tanto el

número de genes de la lista que están involucrados en una determinada vía de señalización como un valor de significación estadística de la sobrerrepresentación.

Para el uso de WebGestalt, se seleccionó el organismo de estudio (*Homo sapiens*), el tipo de análisis (ORA o GSEA) y la base de datos de interés. Se introdujo el listado de genes diferencialmente expresados en cada caso utilizando los identificadores *Gene symbol* (para los datos de los *microarrays* de expresión), y *UniProt ID* (para los datos del proteoma).

Después, se seleccionó “genome protein-coding” como conjunto de datos de referencia y se estableció varios parámetros para el análisis y la visualización de los datos: número mínimo y máximo de genes por categoría, el ajuste para testeo múltiple y el nivel de significancia (según FDR o según las vías más sobrerrepresentadas aun sin significación estadística). Así, se obtuvo una lista de las rutas de señalización con alteraciones diferenciales entre las distintas condiciones a comparar.

15. Restauración de la expresión de *DNAJC15* en la línea celular 32816-R

En este trabajo, se identificó una disminución de la expresión de *DNAJC15* en las líneas celulares resistentes a taxanos, siendo especialmente acusada en la línea celular 32816-R, en la que no se detectó la expresión de MCJ, la proteína codificada por este gen. Para comprobar si esta alteración es esencial para el mantenimiento de la resistencia, se decidió restablecer la expresión de *DNAJC15* en la línea celular 32816-R. Para ello, se clonó el cDNA de este gen en el vector lentiviral pLVX-puro, que presenta el gen de la resistencia a la puromicina. Posteriormente, se transfectaron las células HEK 293T para la producción de virus y se infectaron las células 32816-R. Las células que incorporaron la construcción se seleccionaron con puromicina. Después, se analizó la respuesta a paclitaxel para determinar si este restablecimiento de la expresión causaba una reversión de la resistencia. El procedimiento se describe en detalle a continuación.

15.1. Clonación del cDNA de *DNAJC15* en el vector pLVX-puro

En primer lugar, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar del cDNA de *DNAJC15* con los sitios de corte de las enzimas EcoRI y BamHI, cuyos sitios de corte se encuentran también en el vector pLVX-puro, para poder emplear estas enzimas para digerir el plásmido e insertar el cDNA. El diseño se hizo empleando el programa

SnapGene® Viewer v.5.2 (**Figura 34**). La secuencia de los oligonucleótidos diseñados se recoge en la **Tabla 18**.

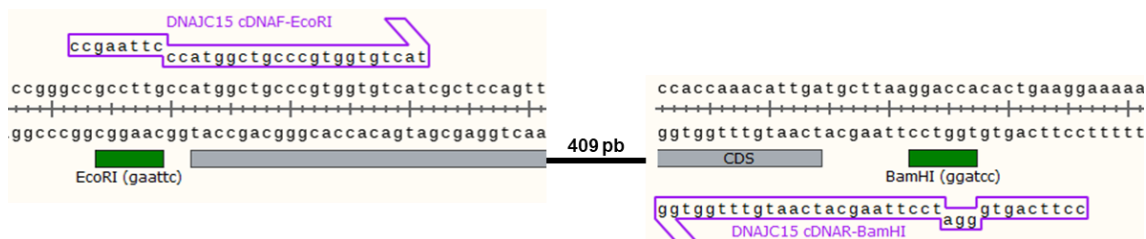


Figura 34. Diseño de los oligonucleótidos para amplificar el cDNA de *DNAJC15*. El oligonucleótido en sentido *forward* se encuentra al inicio de la secuencia de cDNA, mientras que el oligonucleótido en sentido *reverse* se encuentra al final de la secuencia de cDNA. Se ha incorporado el sitio de corte de las enzimas EcoRI y BamHI a los oligonucleótidos *forward* y *reverse*, respectivamente, que no hibrida de forma exacta con la secuencia adyacente al cDNA de *DNAJC15*, pero sí que presenta un grado de complementariedad bastante elevado.

Tabla 18. Secuencias de oligonucleótidos diseñadas para la amplificación del cDNA de *DNAJC15*.

Gen	Oligonucleótido <i>forward</i>	Oligonucleótido <i>reverse</i>	Tamaño del amplicón
DNAJC15 cDNA completo	5' CCGAATTCCCATGGCTGCCCGTGGTGCAT 3'	5' CCTTCAGTGGGATCCTTAAGCATCAATGTTTGGTGG 3'	453 pb

El siguiente paso fue la amplificación del cDNA de *DNAJC15* a partir de cDNA total, a su vez sintetizado a partir del RNA total extraído de las células 32816 parentales en cultivo, que expresan este gen. Para ello, se llevó a cabo una PCR, siguiendo el protocolo descrito previamente, con temperatura de anillamiento de 60°C. Se empleó 1 µl de cDNA a 100 ng/µl para la reacción. La correcta amplificación de este fragmento de 453 pb se comprobó mediante electroforesis horizontal en un gel con un 2% de agarosa en *buffer* TBE 0,5X. El producto de PCR se purificó empleando el kit comercial *GeneJET PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific), obteniendo así el inserto de interés y cuantificando la concentración de DNA por espectrofotometría con el *NanoDrop® 2000*.

Para la inserción del cDNA del *DNAJC15* en el vector pLVX-puro se emplearon las enzimas EcoRI y BamHI. En la **Figura 35** se muestran la estructura de este vector lentiviral con los sitios de corte de las enzimas.

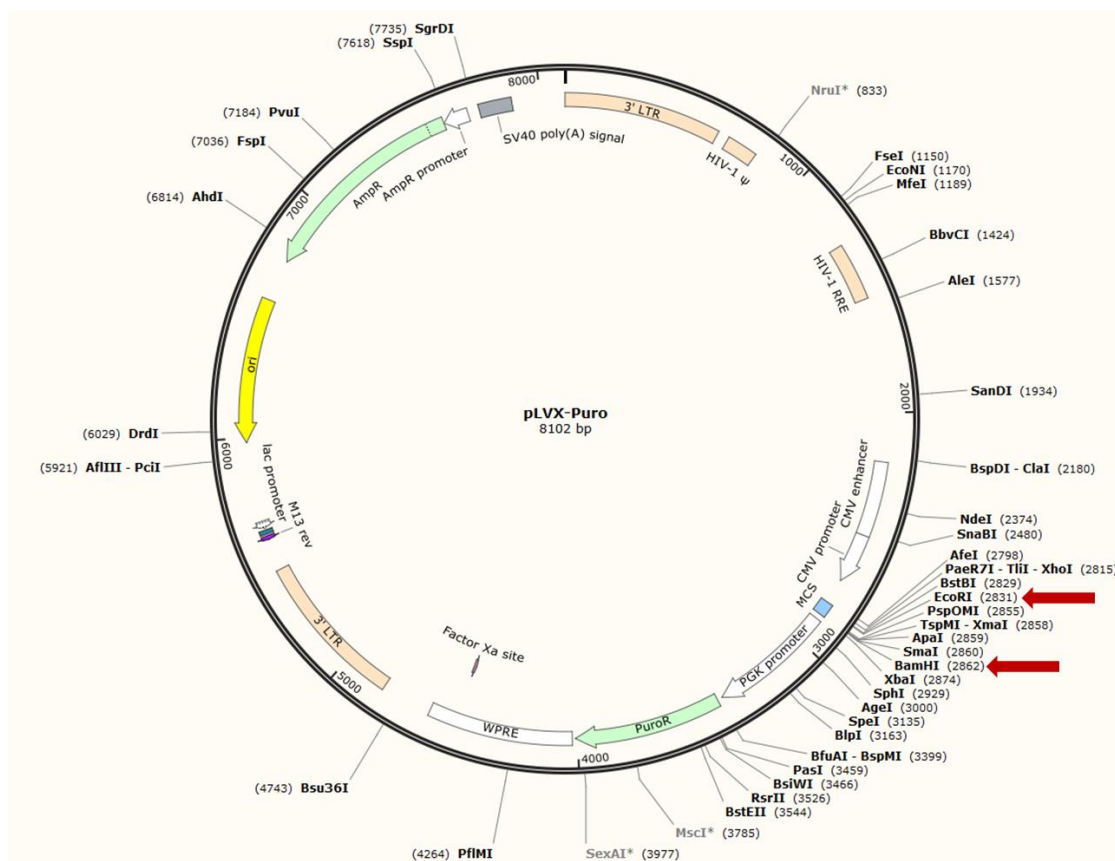


Figura 35. Esquema del vector pLVX-puro empleado para la clonación del cDNA de *DNAJC15*. Se señalan los sitios de corte de las enzimas EcoRI y BamHI. Elaborado con SnapGene® Viewer v.5.2.

El siguiente paso fue la digestión simultánea con las enzimas EcoRI y BamHI tanto del vector como del inserto. Para determinar las condiciones de la digestión doble se usó la herramienta *online DoubleDigestCalculator* (Thermo Fisher Scientific). Se dejaron a 37°C durante 16 horas, periodo tras el cual se realizó una inactivación térmica durante 20 minutos a 80 grados. La composición de la mezcla de digestión se recoge en la **Tabla 19**.

Tabla 19. Reacción de digestión doble con las enzimas EcoRI y BamHI.

Reactivo	Volumen (μl)
EcoRI 10 U/μl	1
BamHI 10 U/μl	2
Buffer Tango 10X	4
DNA 0,5 μg/μl	1
ddH ₂ O	12
Volumen total	20

A continuación, se preparó un gel al 1,5% de agarosa en *buffer* TAE 1X. Se realizó una electroforesis horizontal usando el vector sin digerir como control. Se cortaron los fragmentos de interés y se purificaron a partir del gel empleando el kit comercial PureLink™ Quick Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

Para ello, se pesó la porción de gel con el fragmento de interés y, en función de eso, se añadió un volumen determinado de *buffer* de solubilización del gel (proporción 3:1 volumen de *buffer*: mg del fragmento de gel). Después, se realizó una incubación a 50°C en un termobloque durante 10 minutos, invirtiendo el tubo cada 2 minutos para asegurar la disolución total del gel. A continuación, se llevó a cabo una purificación del DNA en columnas. Para ello, se pasó la solución a la columna y se centrifugó a >12000 rcf durante 1 minuto. Después, se añadieron 500 µl del *buffer* de lavado y se repitió la centrifugación. Se realizó una centrifugación adicional para eliminar los restos de etanol. Finalmente, se añadieron 50 µl de *buffer* de elución a la columna y se realizó una última centrifugación. Así, se obtuvo, por un lado, el vector pLVX-puro y, por otro, el inserto de interés, digeridos con EcoRI y BamHI y purificados. Se determinó la concentración de DNA mediante espectrofotometría con el NanoDrop® 2000 y las muestras se conservaron a -20°C.

El siguiente paso fue la ligación del vector y el inserto, siguiendo el protocolo de la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Fisher Scientific). La mezcla de reacción se describe en la **Tabla 20**. Se emplearon 50 ng de vector y, para el cálculo de los ng de inserto, se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{ng inserto} = (50 \text{ ng vector} * \text{tamaño inserto}) / (\text{tamaño vector}) * 3/1$$

La ligación se llevó a cabo mediante una incubación de 10 minutos a 22°C, usando un termobloque.

Tabla 20. Reacción de ligación del plásmido pLVX-puro y el inserto de interés, correspondiente al cDNA de *DNAJC15*.

Reactivo	Volumen (µl)
Vector pLVX-puro 100 ng/µl	0,5
Inserto de interés (cDNA DNAJC15) 10 ng/µl	0,8
<i>Buffer</i> T4 ligasa 10X	2
Enzima T4 ligasa 5 Weiss U/µl	0,2
ddH ₂ O	16,5
Volumen total	20

Posteriormente, se emplearon 5 μ l del producto de ligación para transformar 50 μ l de bacterias competentes DH5 α tal y como se ha descrito previamente. Se picaron 15 colonias y se dejaron crecer en 2 ml de medio 2XTY con 100 μ g/ml de ampicilina a 37°C, en una estufa con agitación, durante 24 horas. Después se extrajo y purificó el DNA plasmídico siguiendo las instrucciones del kit comercial *GeneJET Plasmid Miniprep Kit*. La concentración del DNA plasmídico obtenido se midió mediante espectrofotometría con el *NanoDrop® 2000* y las muestras se conservaron a -20°C.

Para comprobar la correcta ligación del inserto en el vector, se realizó una digestión con la enzima HincII y después se realizó una electroforesis horizontal en un gel al 1% de agarosa en *buffer* TBE al 0,5%. La reacción de digestión se muestra en la **Tabla 21**. Se dejó a 37°C durante 16 horas.

Tabla 21. Reacción de digestión con la enzima HincII.

Reactivo	Volumen (μ l)
Hinc II 10 U/ μ l	1
<i>Buffer</i> Tango 10X	2
DNA 0,5 μ g/ μ l	1
ddH ₂ O	16
Volumen total	20

Esta enzima presenta tres sitios de corte distintos en el vector pLVX-puro de modo que, tras la digestión, se generaron tres fragmentos de DNA plasmídico linealizado de los siguientes tamaños: 3208 pb, 2706 pb y 2188 pb. En aquellos casos en los que la ligación se había producido de manera eficiente, los fragmentos obtenidos presentaban distinto tamaño: 3296 pb, 3055 pb y 2188 pb, siendo los fragmentos de 3296 pb y 3055 pb indistinguibles en un gel al 1% de agarosa. De este modo, se pudo identificar aquellos casos en los que se había obtenido la construcción pLVX-DNAJC15-puro, 12 de 15 (**Figura 36**).



Figura 36. Digestión con la enzima HincII del vector pLVX-puro tras la ligación con el inserto correspondiente al cDNA de DNAJC15.

Tras esta comprobación, se secuenciaron aquellos plásmidos que parecían haber incorporado el inserto a partir del promotor CMV, en sentido *forward*. Se prepararon para secuenciar 300 ng de cada una de las construcciones, con 2 µl de oligonucleótido CMVF (3 pmol), cuya secuencia es 5' CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG 3', en un volumen total de 8 µl, completado con ddH₂O. La secuenciación se realizó por el método de Sanger en el Servicio de Secuenciación del ADN de la Universidad de Salamanca, donde se empleó un secuenciador automático *ABI PRISM 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). En la **Figura 37** se muestra una la secuencia del vector pLVX-DNAJC15-puro.

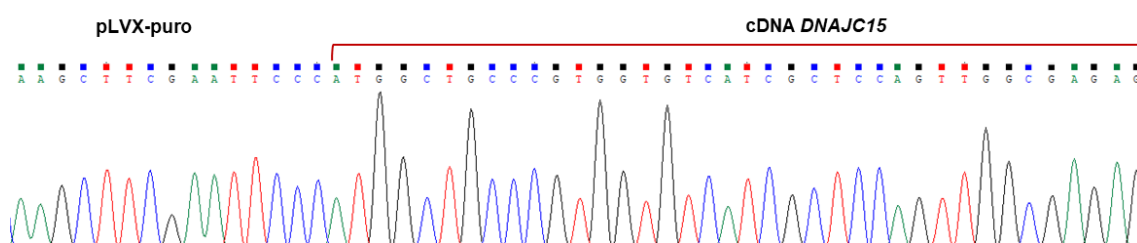


Figura 37. Secuencia del vector pLVX-DNAJC15-puro. Comprobación de la inserción del cDNA del gen *DNAJC15*.

Una vez identificadas las colonias que habían insertado correctamente las guías en el plásmido, se repitió la extracción de DNA empleando el kit *GeneJET Plasmid Maxiprep Kit* (Thermo Fisher Scientific) para obtener mayores cantidades del material genómico. La concentración del DNA plasmídico obtenido se midió mediante espectrofotometría con el *NanoDrop® 2000*. Se preparó una alícuota a 1 µg/µl y las muestras se conservaron a -20°C.

15.2. Transfección de las células HEK 293T

Tras la construcción del vector lentiviral pLVX-DNAJC15-puro, se procedió a la transfección de las células productoras de virus HEK 293T tanto con este plásmido como con el plásmido sin inserto, como control. Para ello, se siguió el método de transfección del fosfato cálcico, que se basa en la formación de un co-precipitado de fosfato cálcico y DNA que permite su unión a la superficie celular y la entrada del DNA en la célula por endocitosis.

Para seguir este procedimiento, en primer lugar, se contaron las células con la cámara de Neubauer y se sembraron 1×10^6 células HEK 293T por condición en placas P100 con medio DMEM suplementado con un 10% de FBS y un 1% de P/S. 24 horas después, se cambió el medio de cultivo por medio fresco y, dos horas más tarde, se

realizó la transfección tanto de los vectores de interés, como el plásmido empaquetador PAX2 y el plásmido de envuelta pMD2-G. Para ello, se preparó la mezcla de transfección que se recoge en la **Tabla 22**. El HBS 2X se incorporó al resto de la mezcla gota a gota mientras se generaban burbujas en la mezcla con la ayuda de un pipeteador y una pipeta Pasteur de vidrio. La mezcla se dejó incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se añadió gota a gota sobre la placa HEK 293T. Tras 24 horas, se cambió el medio de las placas por medio fresco. Se hizo en paralelo para el vector pLVX-puro sin inserto y para el vector pLVX-DNAJC15-puro.

Tabla 22. Mezcla para la transfección mediante fosfato cálcico de las células HEK 293T con los vectores pLVX-puro y pLVX-DNAJC15-puro.

Reactivo	Volumen (μl)
Vector pLVX-puro o pLVX-DNAJC15-puro 1 μg/μl	10
Vector PAX2 1 μg/μl	7,5
Vector pMD2-G 1 μg/μl	2,5
ddH ₂ O	415,38
CaCl ₂ 2M	64,32
HBS 2X	500
Volumen total	1000

15.3. Infección de las células 32816-R

El último paso para el restablecimiento de la expresión del gen *DNAJC15* en la línea celular resistente a taxanos 32816-R fue la infección de estas células con los virus producidos por las células HEK293T transfectadas con los vectores de interés, el plásmido pLVX-DNAJC15-puro y el plásmido pLVX-puro como control.

Para ello, 24 horas tras la transfección de las células HEK 293T, se despegaron las células 32816-R en cultivo, se realizó el conteo de las mismas con la cámara de Neubauer y se sembraron 1x10⁶ células por placa en 3 placas P100, una de ellas para ser infectada con la construcción de interés, otra con la construcción como control y la tercera para ser empleada como control de selección.

A continuación, 24 horas tras la siembra de las células 32816-R y 48 horas tras la transfección de las células HEK 293T se recogió el medio de cultivo de estas últimas y se centrifugó a 2000 rpm durante 5 minutos para descartar las células muertas o despegadas. Se añadió medio de cultivo fresco a las células HEK 293T. A continuación,

el sobrenadante se filtró empleando un filtro de 0,45 µm. A este se le añadió polibreno a una concentración de 8 µg/ml. Se retiró el medio de las células 32816-R, se realizó un lavado y se añadió el medio procedente de las células HEK 293T, filtrado y con polibreno. 24 horas después, es decir, 72 horas tras la transfección de las células HEK 293T, se repitió este procedimiento. Al día siguiente de esta segunda infección de las células 32816-R, se les cambió el medio de cultivo por medio fresco y otro día después comenzó la selección de las células que habían incorporado las construcciones.

Dado que el plásmido pLVX-puro contiene el gen de resistencia a puromicina, se usó el tratamiento con puromicina para seleccionar las células que habían incorporado la construcción. En paralelo, se trató una placa sin infectar, como control de selección, hasta que la muerte celular fue total. En ese momento, se consideró que las células vivas presentes en las placas infectadas habían incorporado el vector. Para esto, de manera previa al desarrollo de este experimento, se probaron distintas concentraciones de puromicina en la línea celular 32816-R y se seleccionó la de 10 µg/ml, que causaba una muerte celular total en menos de 1 semana.

El proceso seguido para el restablecimiento de la expresión de DNAJC15 en las células 32816-R se resume en la **Figura 38**.

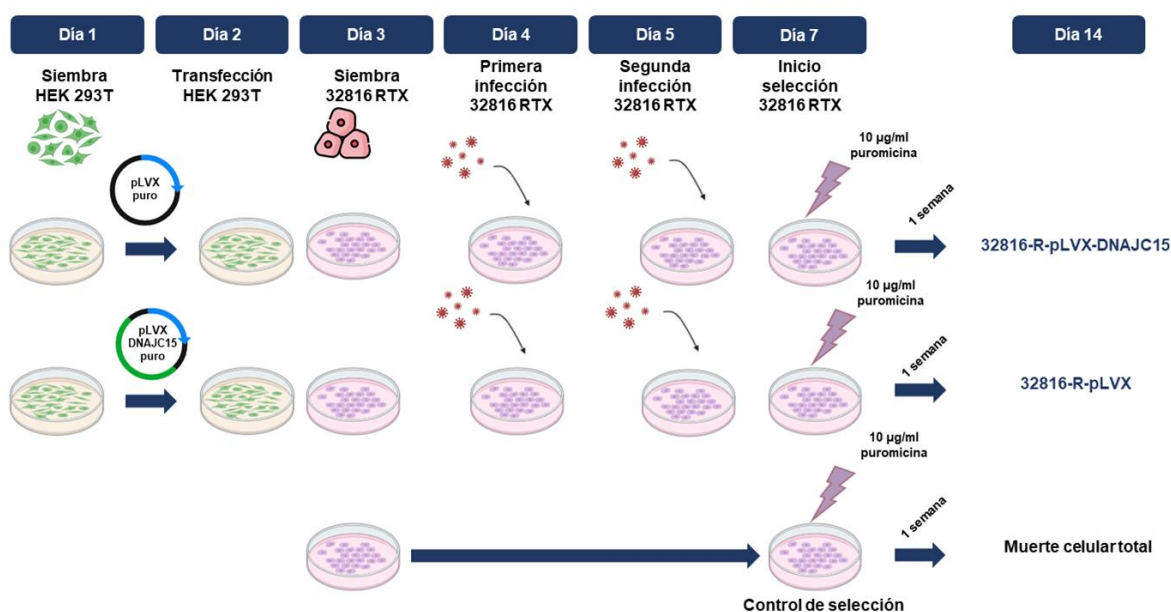


Figura 38. Procedimiento para restablecer la expresión de *DNAJC15* en la línea celular HEK 293T empleando vectores lentivirales. Elaborado con imágenes de www.biorender.com.

Tras finalizar el proceso de selección de las células, se confirmó que aquellas infectadas con la construcción pLVX-DNAJC15-puro expresaban el gen DNAJC15 mediante *western blot*, siguiendo el procedimiento descrito previamente.

15.4. Estudio de la respuesta a paclitaxel de las células 32816-R tras el restablecimiento de la expresión de *DNAJC15*

Para determinar si la disminución pronunciada de la expresión del gen *DNAJC15* es una alteración esencial para el desarrollo de la resistencia a taxanos, se decidió analizar la respuesta a paclitaxel tras restablecer su expresión y determinar si se producía una reversión de la resistencia. Para ello, se realizó un ensayo de viabilidad MTT tratando las células con seis dosis de paclitaxel (2, 5, 5, 10, 15, 30, 50 nM) a 3 tiempos diferentes (24, 48 y 72 horas), tal y como se ha descrito previamente. Los valores de absorbancia obtenidos se normalizaron respecto a un control sin tratar. Se realizaron tres réplicas independientes de este experimento.

16. Tratamiento estadístico de los datos

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa informático IBM/SPSS® Statistics v.29.0.

En los ensayos en líneas celulares las variables cuantitativas se describieron mediante la media, como parámetro de tendencia central, y la desviación estándar, como medida de dispersión. Se tuvieron en cuenta todas las réplicas de los distintos experimentos, incluyendo aquellas de las que no se muestra el resultado cualitativo. Las diferencias entre los grupos comparados se analizaron mediante la prueba t de Student cuando tenían una distribución normal validada mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov. Se consideró la existencia de significación estadística cuando el p-valor inferior fue a 0,05. Esto aplica a los ensayos de viabilidad celular, apoptosis, migración celular, COMET y *western blot*. En cuanto al estudio de microarrays de expresión, se consideró un fold change inferior a -2 o superior a 2 y un p-valor inferior a 0,05 para establecer los cambios de expresión significativos.

En el estudio de aCGH realizado con muestras de pacientes se comparó la frecuencia de las alteraciones genómicas entre los subgrupos de respuesta mediante el test exacto de Fisher, considerando significativo un p-valor inferior a 0,05.



RESULTADOS

RESULTADOS

CAPÍTULO I. Generación de líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello resistentes a taxanos.

1. Inducción de resistencia a paclitaxel en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello

La inducción de resistencia a paclitaxel se llevó a cabo en líneas celulares de CECC (CAL33, 32816 y 32860) mediante incremento progresivo de dosis de agente citotóxico durante 25 ciclos. Posteriormente, se comparó el efecto del paclitaxel entre las líneas celulares de CECC generadas y las parentales de las que proceden mediante el ensayo de viabilidad MTT, empleando 6 dosis diferentes de fármaco y 3 tiempos (Figura 39).

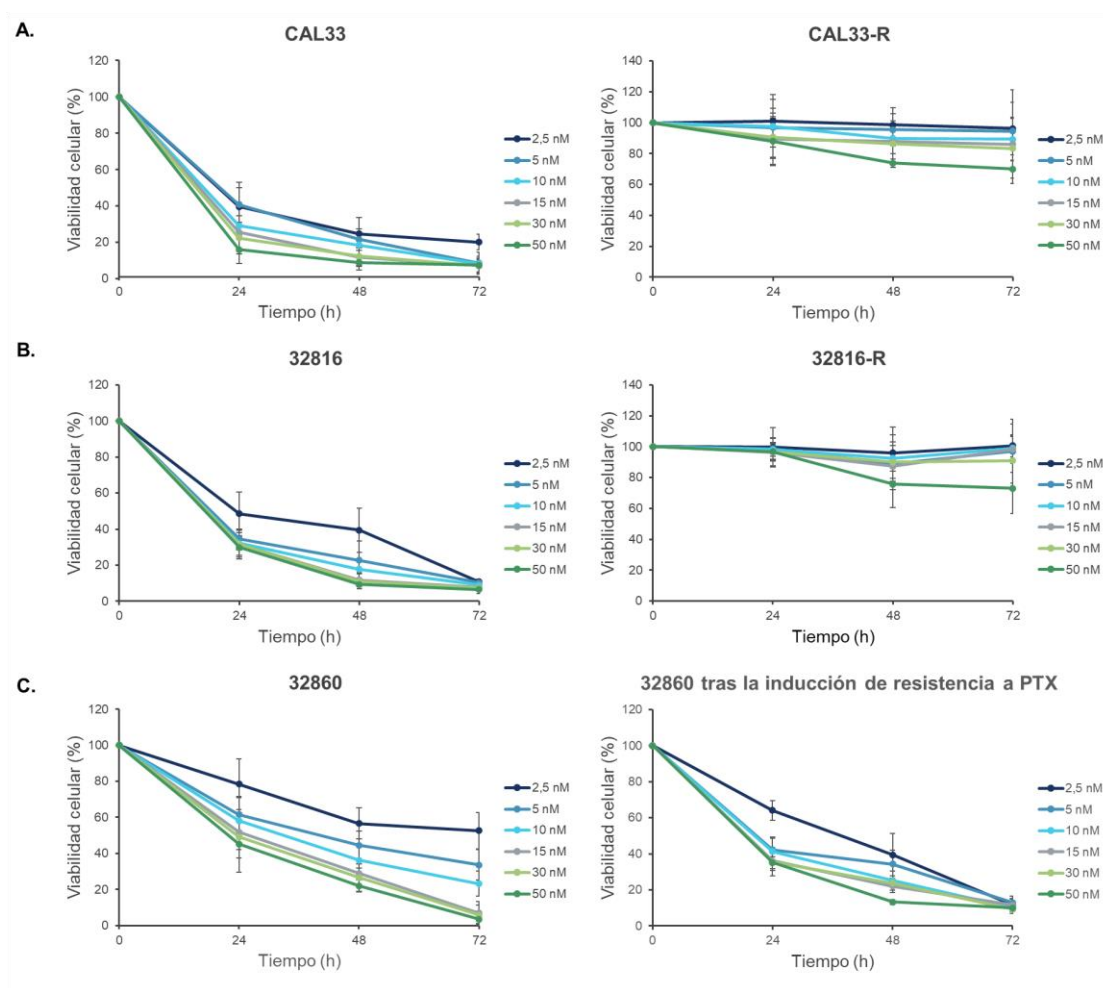


Figura 39. Respuesta a paclitaxel determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de las líneas celulares de CECC antes y después de la inducción de resistencia. A. CAL33; B. 32816; C. 32860.

Se determinaron los valores de IC50 de las líneas celulares parentales y generadas tras la inducción de resistencia a los distintos tiempos (**Tabla 23**). La línea celular parental 32860 presentó una menor sensibilidad a paclitaxel que las otras dos líneas celulares, tal y como queda reflejado en la comparación de los valores de IC50. Tras el proceso de inducción de resistencia a paclitaxel, las líneas celulares CAL33 y 32816 presentaron una viabilidad celular superior al 70% con todas las dosis y tiempos empleados en el ensayo, de modo que se puede considerar que se han establecido dos líneas celulares de CECC resistentes a paclitaxel, denominadas CAL33-R y 32816-R. Sin embargo, la línea celular 32860 presentó un incremento en la sensibilidad a paclitaxel tras el proceso de inducción de resistencia, de modo que no fue posible establecer una línea celular resistente a paclitaxel a partir de esta línea celular. En todas las líneas celulares sensibles al paclitaxel se observó una respuesta dependiente del tiempo y de la dosis de fármaco.

Tabla 23. Valores de la IC50 de paclitaxel en las líneas celulares de CECC, tanto las parentales como las obtenidas tras la inducción de resistencia a paclitaxel.

		Línea celular					
		CAL33	CAL33-R	32816	32816-R	32860	32860 tras paclitaxel
IC50 (nM)	24 h	3,225	-	4,144	-	18,40	7,071
	48 h	1,225	-	1,736	-	5,090	2,664
	72 h	0,6596	-	0,4571	-	2,517	0,5639

La resistencia a paclitaxel de las líneas celulares CAL33-R y 32816-R también se confirmó mediante un ensayo de apoptosis por citometría de flujo (**Figura 40**). En el cuadrante inferior izquierdo se muestra el porcentaje de células vivas en cada caso, pudiendo observar una reducción importante del mismo en el caso de las líneas celulares parentales CAL33 y 32816 tras el tratamiento con una dosis de 30 nM de paclitaxel durante 72 horas, que presentaron un 30-40% de supervivencia. Por el contrario, en las células CAL33-R y 32816-R no se observó una reducción significativa en el porcentaje de células vivas tras el tratamiento. De este modo, se confirmó mediante otra técnica la generación de dos líneas celulares resistentes a paclitaxel, CAL33-R y 32816-R.

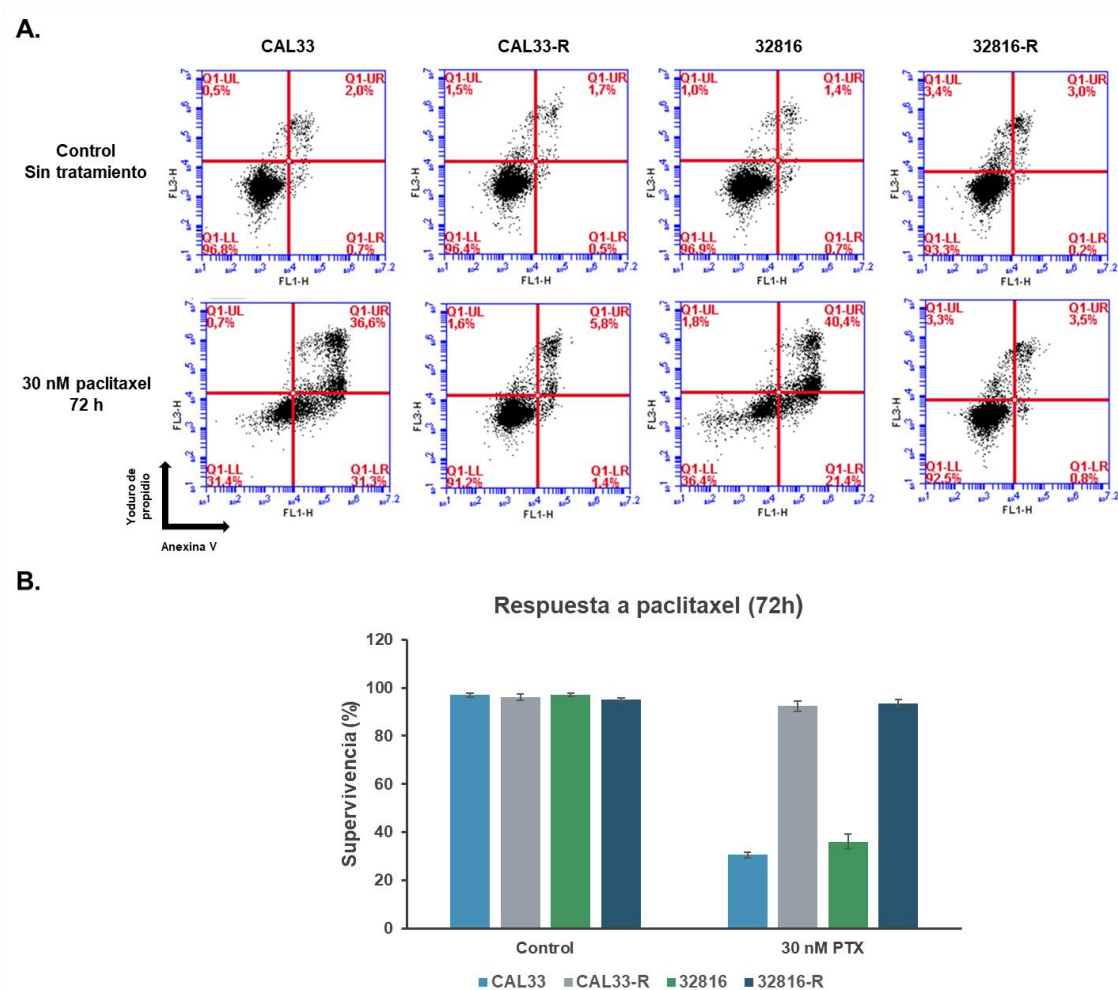


Figura 40. Respuesta a paclitaxel de las líneas celulares parentales y resistentes a paclitaxel determinada mediante un ensayo de apoptosis por citometría de flujo. A. Representación gráfica de las células vivas, necróticas, apoptóticas y necro-apoptóticas tras la exposición a una dosis de 30 nM de paclitaxel durante 72 horas en las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos. B. Porcentaje de células vivas tras el tratamiento con paclitaxel de las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se comparó el porcentaje de células vivas de cada una de las líneas celulares parentales con los de las respectivas líneas celulares resistentes a taxanos: CAL33 frente a CAL33-R y 32816 frente a 32816-R (**: p-valor < 0,01).

Con el fin de determinar si las líneas celulares resistentes a paclitaxel presentaban resistencia cruzada a otros taxanos, se realizó un ensayo de viabilidad MTT comparando la respuesta a docetaxel de estas líneas celulares con la de las parentales, confirmando que las líneas celulares generadas eran también resistentes a docetaxel y no solo a paclitaxel (**Figura 41**). Las líneas celulares parentales, sensibles a docetaxel, mostraron una respuesta dependiente del tiempo y de la dosis de fármaco.

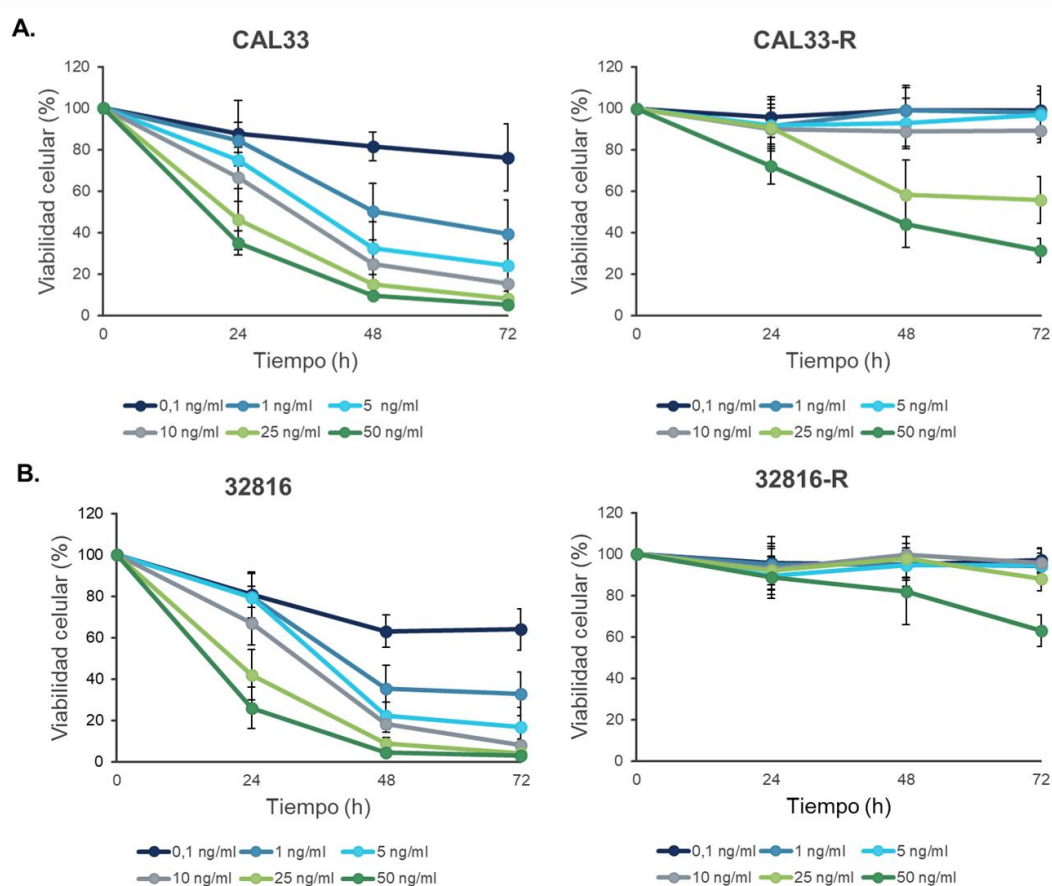


Figura 41. Respuesta a docetaxel determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de las líneas celulares parentales y resistentes a paclitaxel. A. CAL33 y CAL33-R; B. 32816 y 32816-R.

2. Determinación del cariotipo de las líneas celulares

Con el fin de caracterizar las alteraciones asociadas con la resistencia a taxanos en las líneas celulares de CECC se determinó el cariotipo de las líneas celulares parentales (CAL33, 32816 y 32860) y resistentes (CAL33-R y 32816-R), así como de la línea celular 32860 tras el proceso de inducción de resistencia (**Figura 42**). En todos los casos se identificaron varias poblaciones clonales con diferencias en cuanto a cariotipo.

En el caso de la línea celular 32816 parental, el cariotipo principal es hiperdiploide próximo a la diploidía ($2n$), con un número de cromosomas entre 47 y 49 y con diversas alteraciones cromosómicas, como un cromosoma 12 derivativo por traslocación no balanceada de material del cromosoma 3. Además, se han identificado otros clones con un isocromosoma 8, la ganancia de un cromosoma derivativo 1 y la ganancia de un cromosoma derivativo 5. La línea celular 32816-R presenta un cariotipo hiperdiploide próximo a la diploidía, con un número de cromosomas entre 47 y 49, muy similar al

cariotipo de la línea celular parental, pero con algunas alteraciones como la ganancia de un cromosoma 1 y un cromosoma 14.

En cuanto a la línea celular parental CAL33, se identificaron dos cariotipos principales, uno hiperdiploide cercano a la triploidía (3n) con un número de cromosomas entre 63 y 73 y otro hiperdiploide cercano a la tetraploidía (4n) con un número modal entre 92 y 102, siendo este último el cariotipo mayoritario. En el caso de la línea celular resistente, se detectó un enriquecimiento de la población con el cariotipo tetraploide, con pérdida de un cromosoma 4.



Figura 42. Cariotipos representativos de las distintas líneas celulares de CECC. A. 32816 y 32816-R; B. CAL33 y CAL33-R; C. 32860 y 32860 tras la inducción de resistencia a paclitaxel.

Por último, la línea celular parental 32860 presenta un cariotipo hiperdiploide próximo a la diploidía con un número de cromosomas entre 47 y 49 y diversas alteraciones. También se identificaron poblaciones clonales adicionales con ganancias de los cromosomas 1 y 21. La línea celular obtenida tras el proceso de inducción de resistencia a paclitaxel presenta grandes cambios en el cariotipo, a pesar de que estas células no adquirieron resistencia estable a taxanos. En este caso, el cariotipo identificado fue tetraploide. Además, cabe destacar que en estas metafases se observó el fenómeno de endorreduplicación (**Figura 43**).

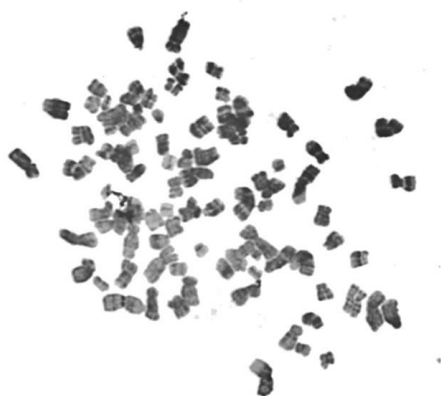


Figura 43. Endorreduplicaciones observadas en las metafases de las células 32860 tras completar el proceso de inducción de resistencia a paclitaxel.

3. Caracterización genética y molecular de la línea celular 32860

La línea celular parental 32860 presentó una mayor resistencia a paclitaxel que las otras líneas celulares de CECC incluidas en este trabajo, CAL33 y 32816. Sin embargo, no adquirió resistencia a paclitaxel, sino que mostró un incremento de sensibilidad tras le exposición a este fármaco. Por ese motivo, se profundizó en el estudio molecular de la misma.

3.1. Caracterización de las alteraciones en el número de copias de las líneas celulares 32860 y 32816

En primer lugar, se analizaron las CNA presentes en la línea celular 32860 y se compararon con las identificadas en la línea celular 32816 (**Figura 44**).

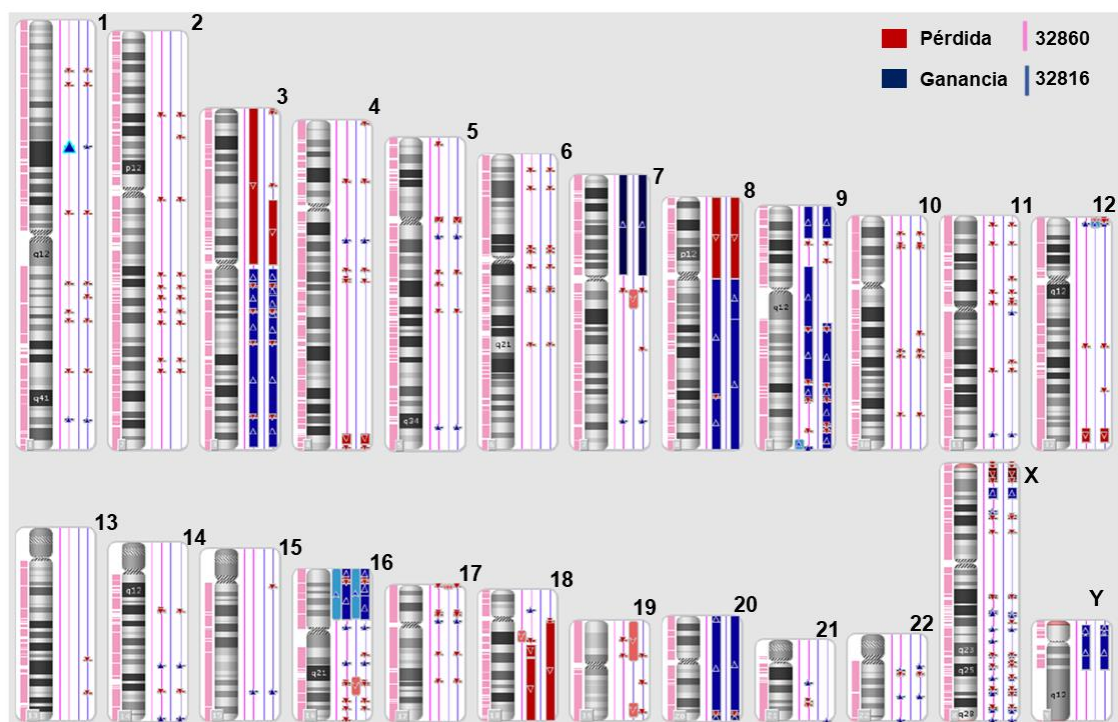


Figura 44. Ganancias y pérdidas de material genético detectadas en cada uno de los cromosomas de las líneas celulares 32816 y 32860 mediante aCGH. La línea celular 32860 se representa en rosa y la línea celular 32816 en azul. Las ganancias de material genético se representan en azul y las pérdidas en rojo.

La mayor parte de alteraciones de gran tamaño que se identificaron estaban presentes en ambas líneas celulares, como ganancias en 3q, 7p, 9p, 9q, 16p, 20p, 20q, Yp e Yq y pérdidas en 3p y 18q, así como la presencia de un isocromosoma 8. También se identificaron alteraciones en regiones de menor tamaño, muchas de ellas comunes para las dos líneas celulares.

Entre las alteraciones diferenciales entre las líneas celulares 32816 y 32860 destacó la pérdida del extremo terminal del brazo cromosómico 3p (región 3p26.3-3p21.1) identificada en la línea celular 32860. Las dos líneas celulares presentan pérdidas de material genético en el brazo cromosómico 3p, pero la región distal solo presenta alteración en la línea celular 32860, siendo esta la región de mayor tamaño con alteración diferencial entre las dos líneas celulares (**Tabla 24**).

Tabla 24. Alteraciones diferenciales identificadas en la línea celular 32860 con respecto a la línea celular 32816 mediante aCGH.

Ganancias			Pérdidas		
Cromosoma	Inicio	Fin	Cromosoma	Inicio	Fin
18	p11.21	p11.21	3	p26.3	p11.1
18	q12.3	q12.3	4	q22.1	q22.1
21	q21.2	q21.2	5	p15.33	p15.33
22	q11.21	q11.21	5	q14.3	q14.3
22	q13.33	q13.33	14	q21.1	q21.1
X	p21.2	p21.2	18	q12.1	q12.1
X	p21.3	p21.3	18	q12.2	q12.3
X	q22.3	q22.3	18	q12.3	q23
			19	p13.2	p13.2
			21	q22.12	q22.12
			21	q22.13	q22.13
			21	q22.13	q22.13

3.2. Análisis de los genes con expresión diferencial entre las líneas celulares 32816 y 32860 mediante *microarrays* de expresión

Tras la identificación de las regiones genómica diferencialmente alteradas en la línea celular 32860, se realizó un estudio del transcriptoma mediante *microarrays* de expresión. En total, se identificaron 1313 genes con expresión diferencial significativa, 767 sobreexpresados y 546 infraexpresados en la línea celular 32860 con respecto a la línea celular 32816, 22 de los cuales se localizaban en la región 3p26.3-3p21.1, perdida en la línea celular 32860 (**Tabla 25**). El análisis de enriquecimiento funcional con el método ORA mediante la herramienta WebGestalt permitió identificar las vías de señalización más sobrerrepresentadas en este conjunto de 22 genes, entre las que se encuentra la autofagia (**Figura 45**). Entre los genes infraexpresados en la línea celular 32860 e implicados en autofagia nos centramos en el estudio del gen *ATG7*.

Tabla 25. Genes expresión diferencial estadísticamente significativa entre las líneas celulares 32816 y 32860 localizados en la región 3p26.3-3p21.1, perdida en la línea celular 32860. En rojo se muestran los genes infraexpresados en la línea celular 32860 con respecto a la línea celular 32816. Los genes se encuentran ordenados de mayor a menor significación estadística.

Gen	Región cromosómica	p-valor	Intensidad de fluorescencia 32816 (log2)	Intensidad de fluorescencia 32860 (log2)
<i>RAF1</i>	3p25	2,34E-05	9,21	7,05
<i>HACL1</i>	3p25.1	2,83E-05	10,24	8,55
<i>ATG7</i>	3p25.3	4,64E-05	10,38	8,23
<i>TRANK1</i>	3p22.2	5,51E-05	7,74	5,38
<i>SETD5</i>	3p25.3	6,01E-05	8,77	7,40
<i>STT3B</i>	3p23	1,00E-04	13,96	11,87
<i>THUMPD3</i>	3p25.3	1,00E-04	9,28	8,09
<i>ZNF35</i>	3p21.32	1,00E-04	8,43	6,60
<i>WDR48</i>	3p21.33	2,00E-04	7,93	6,47
<i>CHCHD4</i>	3p25.1	3,00E-04	8,66	7,19
<i>SLC25A38</i>	3p22.1	3,00E-04	11,01	9,56
<i>TMPPE</i>	3p21.3-3p22.3	3,00E-04	11,17	9,84
<i>DYNC1LI1</i>	3p22.3	4,00E-04	11,75	10,37
<i>GORASP1</i>	3p22-3p21-33	4,00E-04	7,39	5,88
<i>RPSA</i>	3p22.2-3p22.1	6,00E-04	17,33	16,11
<i>TMEM43</i>	3p25.1	6,00E-04	13,22	11,69
<i>CNOT10</i>	3p22.3	9,00E-04	8,74	7,21
<i>THRB</i>	3p24.2	9,00E-04	7,70	5,48
<i>TAMM41</i>	3p25.2	1,10E-03	6,81	5,72
<i>CRTAP</i>	3p22.3	1,30E-03	14,82	13,89
<i>SEC13</i>	3p25-3p24	1,70E-02	11,22	9,02
<i>CMTM6</i>	3p22.3	6,40E-03	11,82	9,35

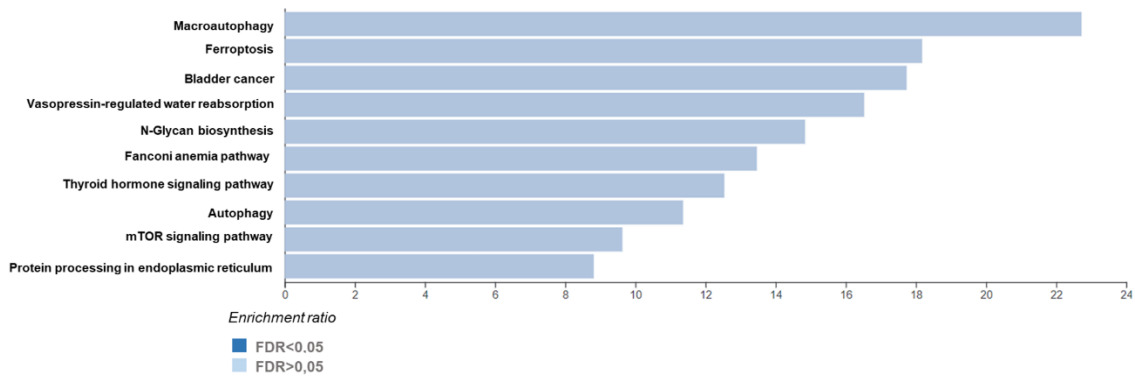


Figura 45. Vías de señalización asociadas a los genes desregulados entre las líneas celulares 32816 y 32860 localizados en la región 3p26.3-3p21.1. Se representan las 10 vías de señalización con una mayor asociación empleando la base de datos KEGG.

3.3. Estudio del proceso de autofagia en la línea celular 32860

El estudio de expresión de ATG7 mediante *western blot* mostró una disminución muy pronunciada de la expresión de esta proteína en la línea celular 32860 en comparación con la línea celular 32816 (**Figura 46**). De este modo, se confirmó que la delección en la región genómica en la que se localiza el gen ATG7 conduce a la infraexpresión de este gen y de la proteína que codifica.

Con el fin de determinar si la autofagia se encontraba alterada en esta línea celular, también se analizó la expresión de otras proteínas implicadas en autofagia mediante *western blot* (**Figura 46**). Se observó una acumulación de p62 y un ratio de LC3 citosólico muy bajo debido a unos niveles de expresión muy reducidos de la isoforma activada de LC3B (LC3B-II) en la línea celular 32860, asociado a un bloqueo de la autofagia. También se detectó una reducción de la expresión de BECLIN1 en la línea celular 32860 con respecto a la línea celular 32816.

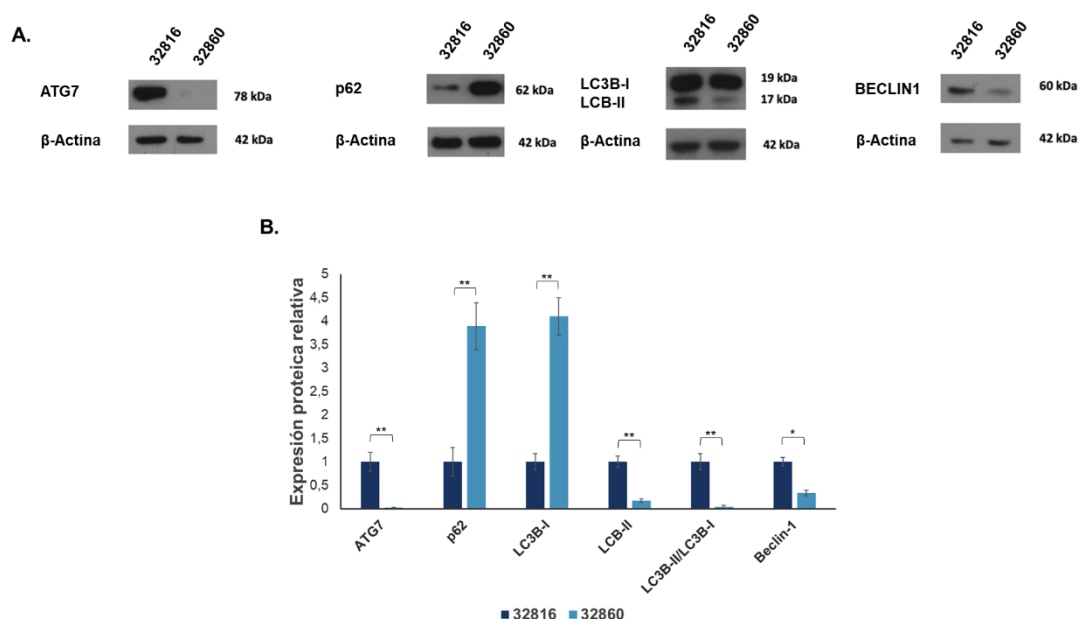


Figura 46. Detección de proteínas implicadas en el proceso de autofagia en las líneas celulares 32816 y 32860. A. Niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*. B. Cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*, normalizados frente a la β-actina como control endógeno y frente a la línea celular 32816 como muestra de referencia. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó el test estadístico de la t de Student para comparar los niveles de expresión entre las células, entre las EVs y entre células y EVs de la misma línea celular. Se señalan las diferencias de expresión con significación estadística (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01).

CAPÍTULO II. Caracterización de la pérdida de ATG7 en la resistencia a taxanos en la línea celular 32816.

Con el objetivo de estudiar el posible papel de la pérdida de ATG7 en la resistencia a taxanos, se inactivó este gen en la línea celular 32816 empleando el sistema CRISPR-Cas9 y se llevó a cabo una caracterización molecular y fenotípica.

1. Inactivación del gen ATG7 en la línea celular 32816 mediante la tecnología CRISPR-Cas9

Se seleccionaron tres clones *knockout* para ATG7 cuya edición génica se validó mediante diferentes técnicas. En primer lugar, se amplificó el exón 10 de la variante 1 de ATG7 y se secuenció mediante el método de Sanger, comparando las secuencias obtenidas para cada clon con la secuencia de la línea celular parental, 32816, y la secuencia de referencia (**Figura 47**).

En los clones 32816-ATG7-KO1 y 32816-ATG7-KO2 se identificó una inserción de 1 nucleótido, distinto en cada caso, que da lugar a un codón de parada prematuro en homocigosis. En el clon 32816-ATG7-KO3 se detectó una delección de 7 nucleótidos en uno de los alelos y una inserción de 1 nucleótido en el otro alelo; ambas alteraciones dan lugar a un codón de parada prematuro. En todos los casos las alteraciones identificadas se localizaban en la secuencia diana de los gRNA.

A continuación, se comprobó la pérdida de expresión génica de ATG7 en los distintos clones *knockout* mediante RT-qPCR cuantitativa comparativa, empleando siempre uno de los utilizado para sintetizar los gRNA (**Figura 48A**). Tal y como se esperaba, los clones control 32816-PX, transfectados con el vector PX458 vacío presentaron unos niveles de expresión semejantes a los de la línea celular parental, mientras en los clones *knockout* para ATG7 únicamente se observó una amplificación residual. Por último, se comprobó mediante *western blot* la pérdida de expresión de la proteína ATG7 en los clones *knockout* (**Figura 48B**).

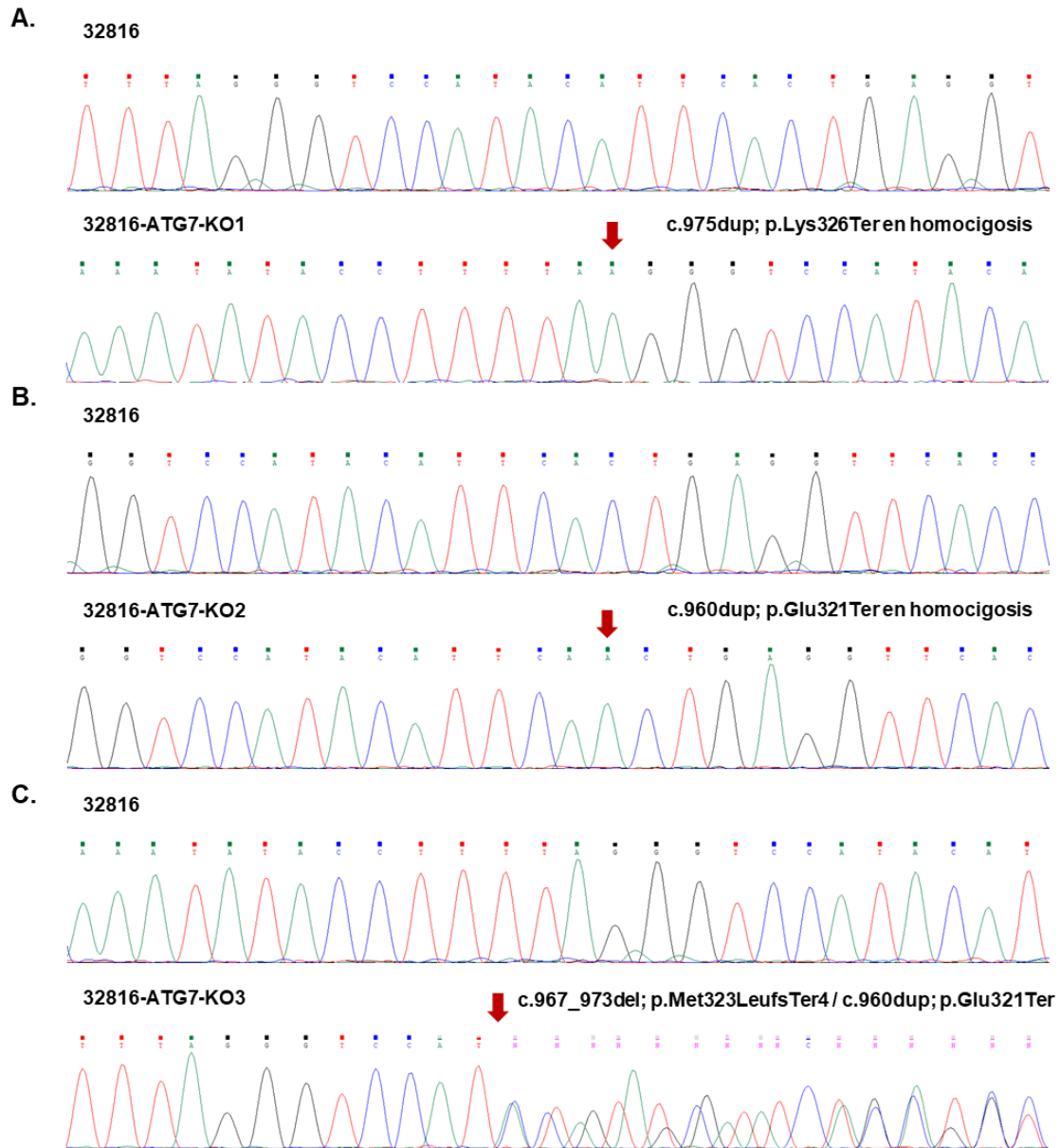


Figura 47. Secuencias de nucleótidos del exón 10 de la variante 1 de ATG7 con las modificaciones identificadas en los diferentes clones *knockout* para ATG7 generados a partir de la línea celular 32816. A: KO1; B: KO2; C: KO3. Se muestra la secuencia de la línea celular parental, coincidente con la secuencia de referencia. Todas las secuencias se leyeron en sentido *reverse*. Se nombran las alteraciones detectadas (NM_006395.3).

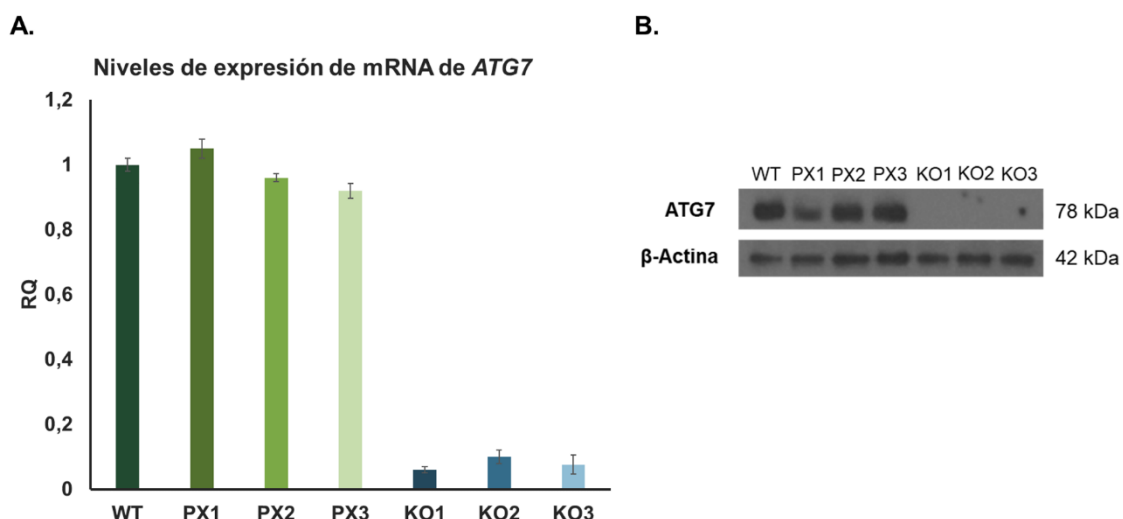


Figura 48. Comprobación de la pérdida de expresión del gen *ATG7* en la línea celular 32816. A. Comparación de los niveles de expresión a nivel de mRNA del gen *ATG7* entre la línea celular parental 32816, los clones 32816-*ATG7*-PX transfectados con el vector PX458 vacío como control, (PX1, PX2 y PX3) y los clones 32816-*ATG7*-KO, *knockout* para *ATG7*, (KO1, KO2 y KO3). Se ha realizado una normalización respecto a los niveles de expresión de la línea celular 32816. B. Detección de la proteína *ATG7* en la línea celular 32816, en los clones 32816-*ATG7*-PX y en los clones 32816-*ATG7*-KO, mediante *western blot*.

2. Estudio de la vía de señalización de la autofagia

Se estudió la vía de señalización de autofagia para determinar si la inactivación de *ATG7* causaba algún efecto en este proceso. Para ello, se analizó la expresión de otras proteínas de la familia ATG (*ATG9*, *ATG16L1* y *ATG5-ATG12*) y de proteínas con un papel importante del proceso de autofagia (*p62*, *BECLIN1*, *LC3C* y *LC3B*) mediante *western blot* (**Figura 49**).

Se identificó una disminución pronunciada de la expresión de *ATG16L1* y *ATG5-ATG12* en los clones *knockout* para *ATG7*. Además, se observó un incremento de *p62* y una disminución prácticamente total de la activación de *LC3B* detectada mediante la ausencia de expresión de la isoforma activada *LC3B-II* y un incremento de expresión de la isoforma no activada, *LC3B-I*, dando lugar a un descenso significativo en el ratio de *LC3B* citosólico (*LC3B-II/LC3B-I*). Estos marcadores indican un bloqueo de la autofagia en los clones *knockout* para *ATG7*.

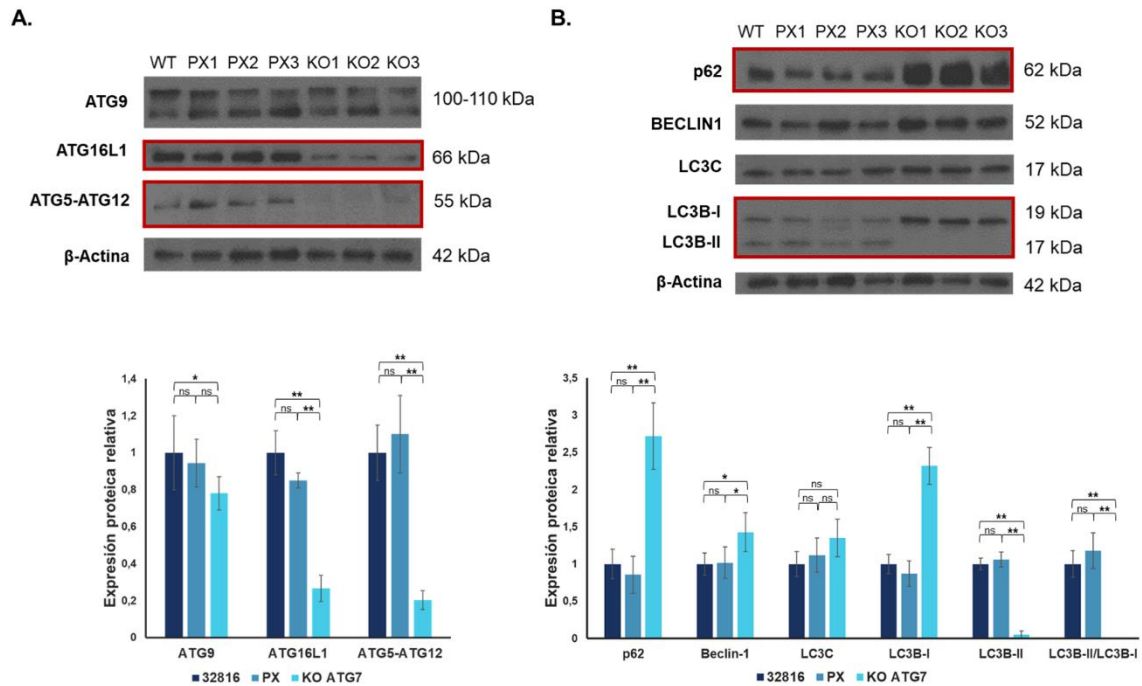


Figura 49. Detección de proteínas implicadas en el proceso de autofagia en la línea celular 32816, en los clones control y en los clones *knockout* para ATG7, mediante *western blot*. A: Niveles de expresión de proteínas de la familia ATG; B: Niveles de expresión de proteínas implicadas en autofagia. En rojo se señalan los cambios de expresión más significativos entre las condiciones control y los *knockout* para ATG7. En la parte inferior se muestra la cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*, normalizados frente a la β-actina como control endógeno y frente a la línea celular 32816 como muestra de referencia. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas para cada una de las condiciones de cada grupo (PX: PX1, PX2 y PX3; KO ATG7: KO1, KO2 y KO3). Se señalan las diferencias de expresión con significación estadística determinadas mediante el test estadístico de la t de Student (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

Para completar el estudio de la vía de señalización de la autofagia, se llevaron a cabo distintos ensayos de co-inmunofluorescencia y se comparó la distribución y el nivel de expresión de distintas proteínas entre los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y los clones 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3).

En primer lugar, se analizaron las proteínas ATG7 y p62, confirmando que los clones 32816-ATG7-KO no expresaban la proteína ATG7 (**Figura 50**). En los clones 32816-PX, sí se detectó esta proteína con una distribución homogénea por todo el citoplasma y, adicionalmente, en el nucleoplasma. También se confirmó el incremento de expresión de la proteína p62.

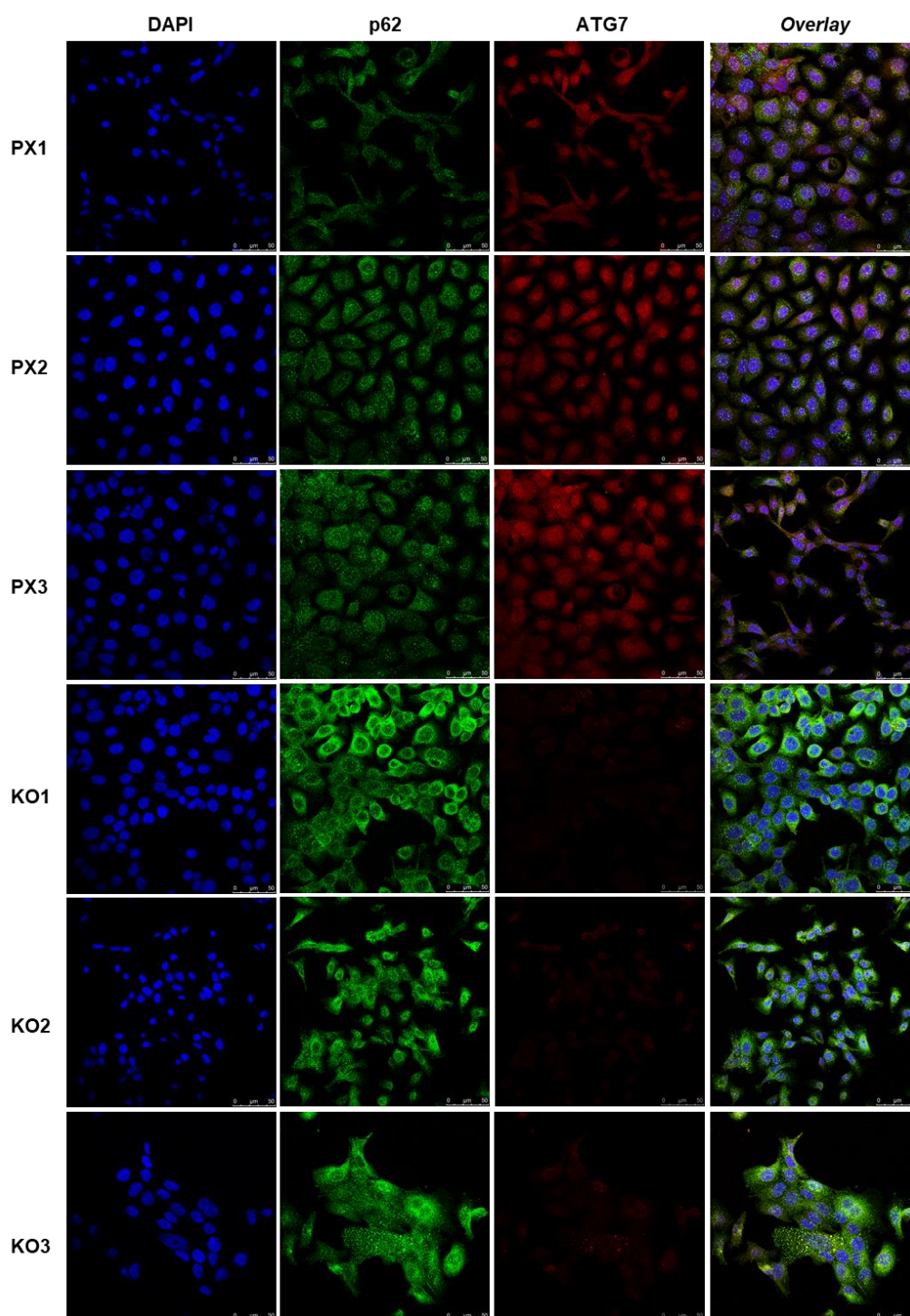


Figura 50. Detección de las proteínas p62 y ATG7 mediante coinmunofluorescencia en los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y los clones 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra una imagen representativa de cada uno de los clones.

La proteína LC3B se detectó en las vesículas citoplasmáticas y en el nucleoplasma tanto en los clones 32816-PX como en los 32816-ATG7-KO (**Figura 51**). Se observó cierto grado de colocalización entre las proteínas p62 y LC3B, especialmente en los clones 32816-PX. En los clones 32816-ATG7-KO se detectó un mayor número de acúmulos de p62.

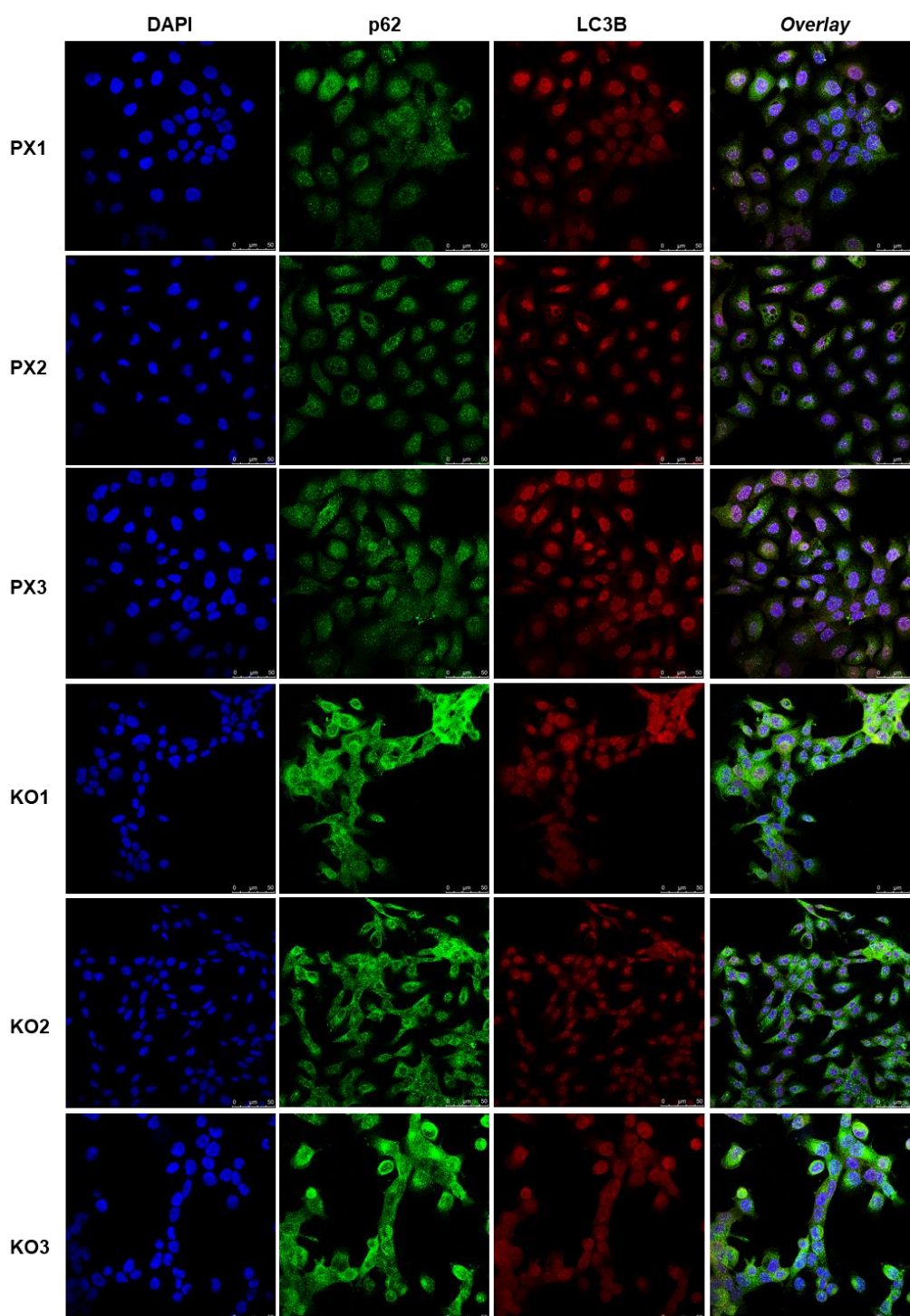


Figura 51. Detección de las proteínas p62 y LC3B mediante coinmunofluorescencia en los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y los clones 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra una imagen representativa de cada uno de los clones.

Finalmente, se analizaron las proteínas p62 y LAMP-1, una proteína de la membrana lisosomal (**Figura 52**). LAMP-1 mostró una expresión citoplasmática granular, aumentada en los clones *knockout* para ATG7. En todos los casos se observó cierto grado de colocalización entre ambas de proteínas, pero no una colocalización total.

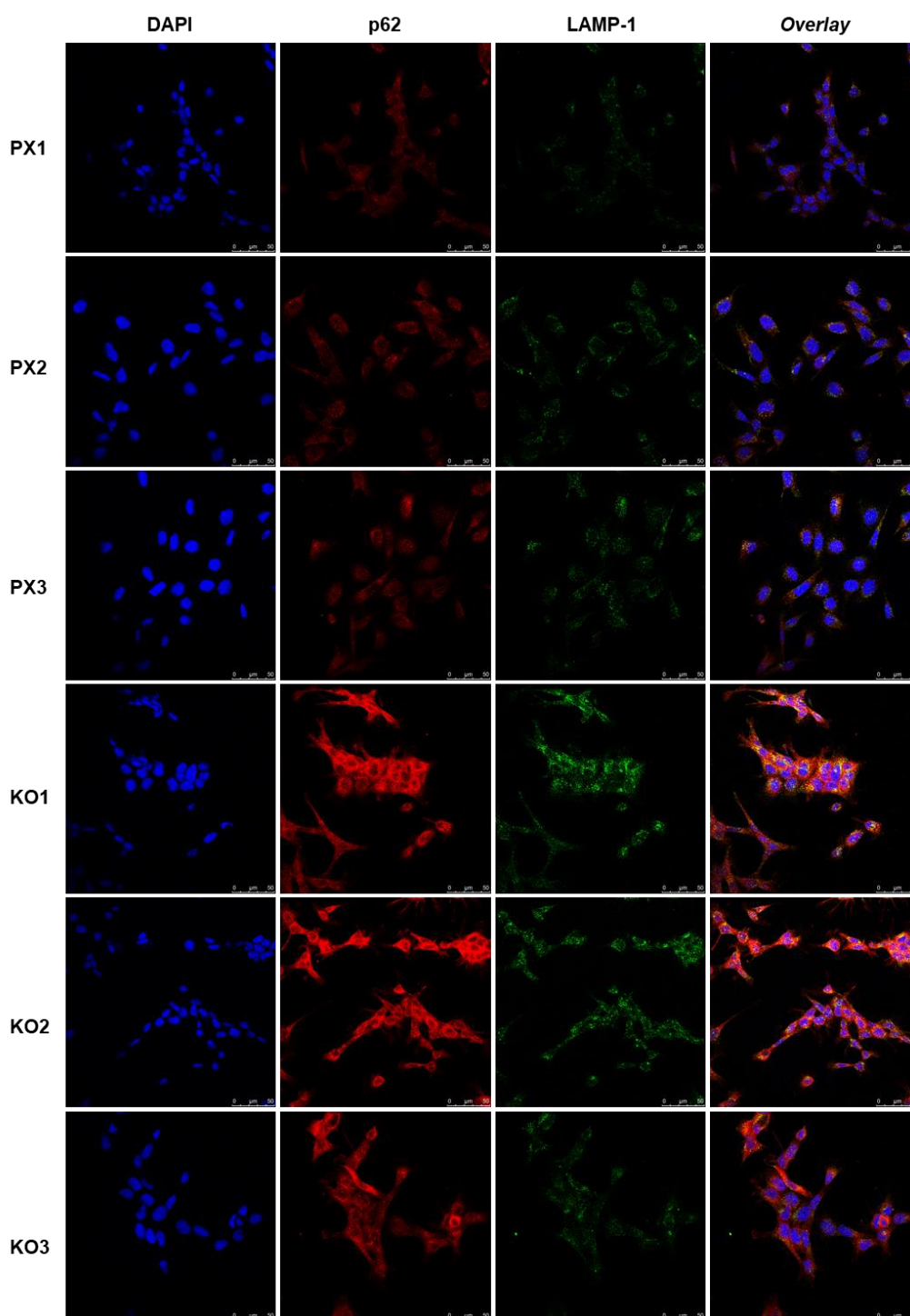


Figura 52. Detección de las proteínas LAMP-1 y p62 mediante coinmunofluorescencia en los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y los clones 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra una imagen representativa de cada uno de los clones.

3. Estudio de la respuesta a paclitaxel

La comparación de la respuesta a paclitaxel mediante un ensayo MTT de los clones 32816-ATG7-KO y los clones 32816-PX reveló una disminución en la sensibilidad a

paclitaxel asociada a la inactivación de ATG7 en la línea celular 32816 (**Figura 53**). Esta tendencia en la respuesta se observó a todos los tiempos y dosis empleados, si bien no en todos los casos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 32816-PX y 32816-ATG7-KO.

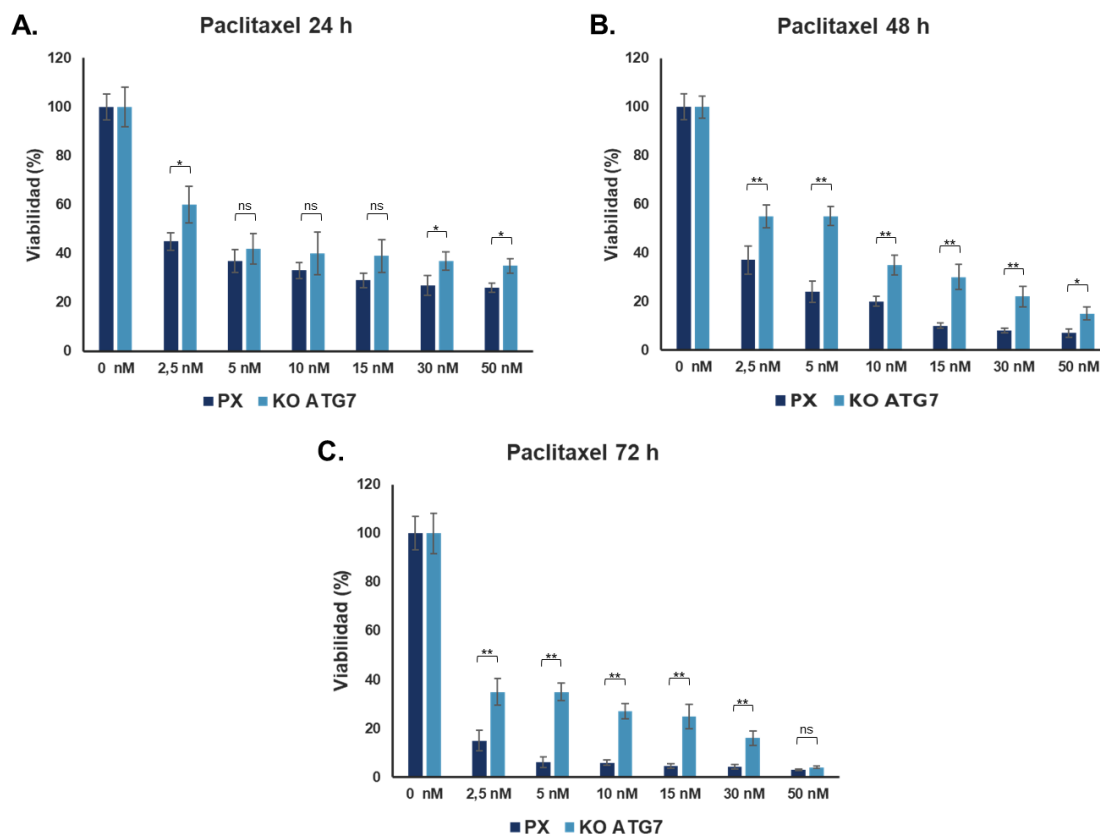


Figura 53. Respuesta a paclitaxel determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de los clones 32816-PX y 32816-ATG7-KO. A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas para cada uno de los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3). Se realizó una normalización frente el control sin tratamiento de cada línea celular a cada tiempo. Se compararon los porcentajes de viabilidad a las distintas dosis y tiempo entre los dos grupos (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

4. Inducción de resistencia a paclitaxel en los clones 32816-ATG7-KO

Se indujo la adquisición de resistencia a taxanos mediante el incremento progresivo de dosis de paclitaxel en los clones 32816-PX y 32816-ATG7-KO, llegando a una concentración máxima de 10 nM. Después, se analizó la respuesta a paclitaxel mediante ensayo de viabilidad celular MTT (**Figura 54**).

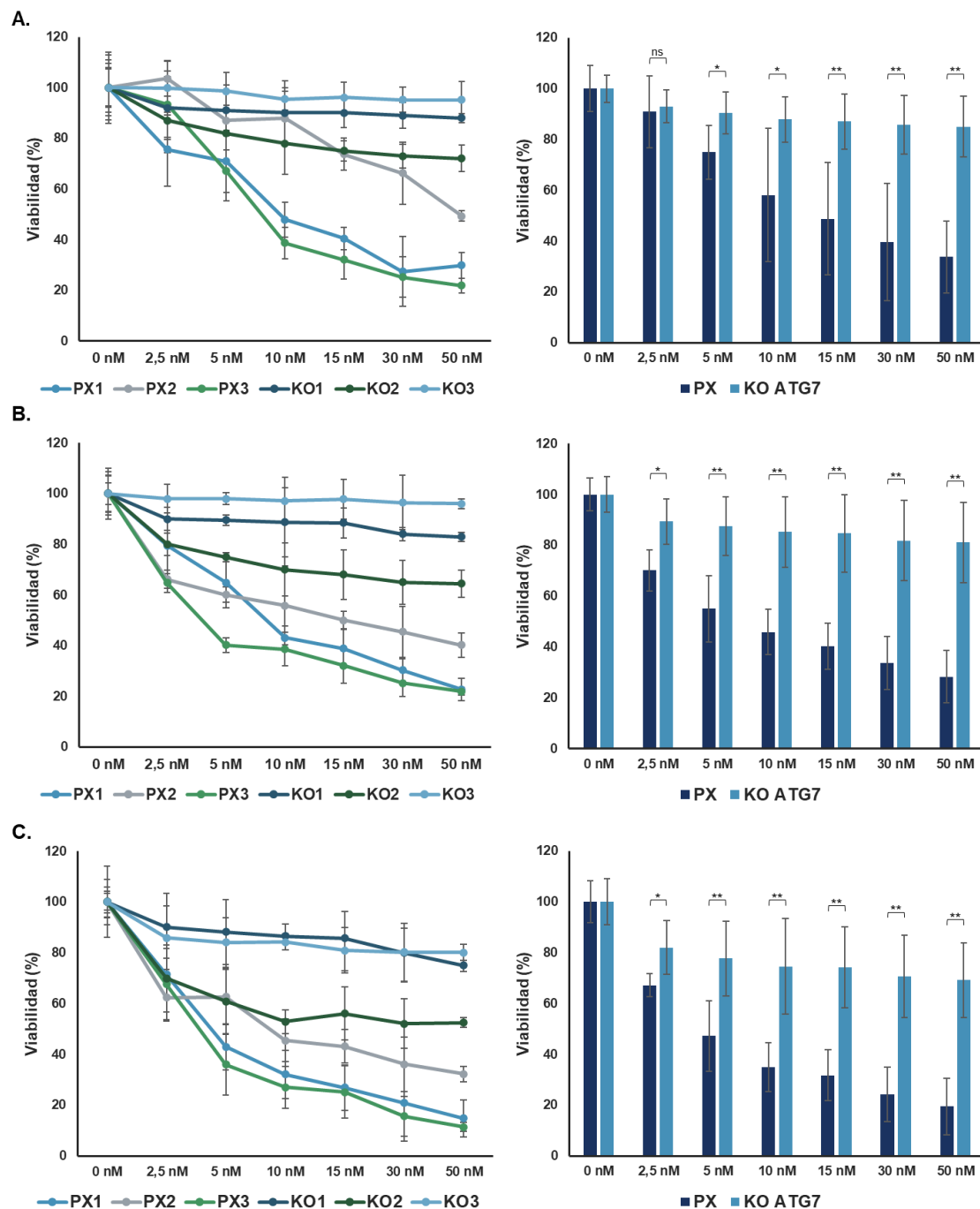


Figura 54. Respuesta a paclitaxel determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de los clones 32816-PX y 32816-ATG7-KO tras la inducción de resistencia a taxanos. A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h. Se realizó una normalización frente el control sin tratamiento de cada línea celular a cada tiempo. En la parte izquierda, se representa la respuesta a paclitaxel de cada clon de manera individual, considerando el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. En la parte derecha, se representa el valor promedio y la desviación estándar de los clones 32816-PX (PX1, PX2 y PX3) y 32816-ATG7-KO (KO1, KO2 y KO3). Se compararon los porcentajes de viabilidad a las distintas dosis y tiempo entre los dos grupos (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

Como se muestra en la **Figura 54**, los clones 32816-ATG7-KO mostraron un incremento en la resistencia a paclitaxel significativamente mayor que los clones control

tras la inducción de resistencia. De hecho, mostraron una disminución de la viabilidad muy reducida incluso en dosis de 50 nM tras la exposición en ciclos sucesivos de tratamiento a un máximo de 10 nM de paclitaxel. De este modo, se generaron tres clones *knockout* para *ATG7* resistentes a paclitaxel a partir de la línea celular 32816. Por otro lado, los clones 32816-PX mostraron una disminución de sensibilidad tras la inducción de resistencia a paclitaxel, pero menos pronunciada que los clones 32816-ATG7-KO (**Figuras 53 y 54**). De este modo, la pérdida de *ATG7* modifica la sensibilidad a paclitaxel y la adquisición de resistencia a este fármaco.

CAPÍTULO III. Identificación de las alteraciones genómicas en muestras tumorales de carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

Con el objetivo de caracterizar el perfil de las alteraciones genómicas presentes en los tumores de pacientes con CECC y establecer su relación con la respuesta al tratamiento, se realizó un estudio de aCGH en 177 muestras tumorales de pacientes homogéneamente tratados con el régimen TPF de QTI. Este estudio de permitió determinar las CNA en la serie global y en los distintos subgrupos de respuesta a la terapia TPF. Asimismo, se analizó la región en la que se localiza el gen *ATG7*, para analizar su estado en muestras tumorales.

1. Perfil de alteraciones genómicas en las muestras de CECC

El análisis del perfil genómico mediante aCGH en la serie global mostró la presencia de alteraciones a nivel de los brazos cromosómicos en el 95% de los casos (**Figura 55**).

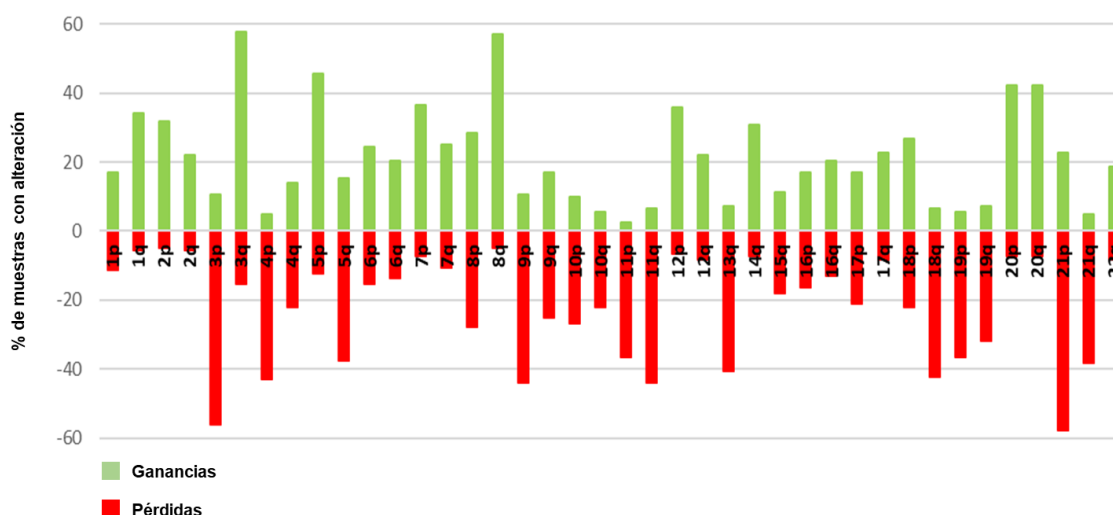


Figura 55. CNA identificadas en la serie global de 177 muestras de CECC procedentes de pacientes incluidos en el ensayo clínico TTCC-2007-01.

Las ganancias más frecuentes se detectaron en los brazos cromosómicos 3q (55%), 8q (51%), 5p (45%), 20p (42%) y 20q (42%) mientras que las pérdidas más recurrentes se localizaron en 3p (51%), 21p (55%), 11q (45%), 9p (44%), 18q (43%) y 4p (42%).

Además, en la serie global se identificaron alteraciones en 101 regiones focales (*focal minimal common regions* o FMCR), 63 de ellas con deleciones significativas y 38 con amplificaciones significativas. Las alteraciones más frecuentes detectadas fueron ganancias en 3q28, 8q23.3, 8q24.21, 11q13.3 y 7p11.2 y tanto ganancias como pérdidas en las regiones 3p12.1, 3p12.3, 3p14.2 y 9p21.3.

2. Asociación de las alteraciones genómicas con la respuesta al régimen TPF

Se analizaron los cambios genómicos en función de tres subgrupos de respuesta a TPF: estabilización de la enfermedad (EE), respuesta completa o parcial (RC/RP) y toxicidad al tratamiento (TOX). Todos los casos con EE presentaban alteraciones genómicas, siendo los cambios más recurrentes observados las ganancias en 3q (47%), 5p (38%) y 20q (38%) y pérdidas en 9p (56%), 18q (53%), 11q (47%), 21q (44,1%) y 3p (41,2%), similares a los encontrados en la serie global.

En cuanto al subgrupo TOX, el 91% de los casos presenta alteraciones, destacando ganancias en 3q (67%), 20q (52%), 8q (48%) y 7p (43%) y pérdidas en 4p (67%), 3p (62%) 9p (57%) y 11q (52%).

Por último, un 95% de los tumores procedentes de pacientes que respondieron de manera total o parcial al régimen TPF presentaron cambios, siendo los más recurrentes las ganancias en 3q (56%), 8q (56%) y 5p (45%) y las pérdidas en 3p (52%), 9p (48%) y 4p (44%) (**Figura 56, Tabla 26**).



Figura 56. CNA identificadas en los CECC de cada uno de los grupos de respuesta a TPF. A. Grupo EE; B. Grupo TOX; C. Grupo RC/RP.

Tabla 26. Comparación de las frecuencias en las alteraciones a nivel de brazos cromosómicos entre los distintos subgrupos de respuesta a TPF (EE, RC/RP y TOX).

Brazo cromosómico	EE				RC/RP				TOX			
	Ganancias	%	Pérdidas	%	Ganancias	%	Pérdidas	%	Ganancias	%	Pérdidas	%
1p	3	8,8	3	8,8	17	13,9	13	10,7	4	19	4	19
1q	8	23,5	2	5,9	38	31,1	7	5,7	8	38,1	3	14,3
2p	9	26,5	1	2,9	38	31,1	6	4,9	7	33,3	1	4,8
2q	5	14,7	-	-	25	20,5	7	5,7	7	33,3	2	9,5
3p	3	8,8	14	41,2	14	11,5	63	51,6	2	9,5	13	61,9
3q	16	47,1	2	5,9	68	55,7	21	17,2	14	66,7	3	14,3
4p	-	-	7	20,6	6	4,9	54	44,3	-	-	14	66,7
4q	3	8,8	6	17,6	19	15,6	30	24,6	1	4,8	6	28,6
5p	13	38,2	4	11,8	55	45,1	18	14,8	6	28,6	4	19
5q	2	5,9	8	23,5	18	14,8	42	34,4	1	4,8	9	42,9
6p	5	14,7	2	5,9	28	23	16	13,1	3	14,3	4	19
6q	1	2,9	5	14,7	23	18,9	15	12,3	3	14,3	3	14,3
7p	5,9	29,4	2	10	46	37,7	8	6,6	9	42,9	2	9,5
7q	6	17,6	4	11,8	25	20,5	14	11,5	5	23,8	1	4,8
8p	6	17,6	11	32,4	30	24,6	36	29,5	3	14,3	7	33,3
8q	12	35,3	2	5,9	68	55,7	6	4,9	10	47,6	2	9,5
9p	1	2,9	19	55,9	12	9,8	59	48,4	2	9,5	12	57,1
9q	3	8,8	11	32,4	22	18	30	24,6	3	14,3	8	38,1
10p	2	5,9	10	29,4	11	9	31	25,4	1	4,8	9	42,9
10q	2	5,9	8	23,5	6	4,9	25	20,5	-	-	7	33,3
11p	1	2,9	13	38,2	3	2,5	43	35,2	-	-	8	38,1
11q	3	8,8	16	47,1	6	4,9	52	42,6	-	-	11	52,4
12p	11	32,4	1	2,9	42	34,4	8	6,6	7	33,3	4	19
12q	5	14,7	2	5,9	25	20,5	10	8,2	1	4,8	3	14,3
13q	1	2,9	14	41,2	9	7,4	45	36,9	1	4,8	7	33,3
14q	7	20,6	4	11,8	40	32,8	11	9	7	33,3	5	23,8
15q	7	20,6	4	11,8	12	9,8	21	17,2	2	9,5	7	33,3
16p	5	14,7	4	11,8	20	16,4	19	15,6	4	19	5	23,8
16q	6	17,6	1	2,9	23	18,9	17	13,9	6	28,6	2	9,5
17p	4	11,8	9	26,5	18	14,8	28	23	2	9,5	6	28,6
17q	5	14,7	-	-	25	20,5	10	8,2	3	14,3	3	14,3
18p	10	29,4	8	23,5	33	27	27	22,1	6	28,6	4	19
18q	2	5,9	18	52,9	8	6,6	50	41	1	4,8	8	38,1
19p	1	2,9	13	38,2	8	6,6	40	32,8	1	4,8	9	42,9
19q	2	5,9	11	32,4	10	8,2	35	28,7	1	4,8	6	28,6
20p	17,6	23,5	6	8	45	36,9	10	8,2	10	47,6	1	4,8
20q	13	38,2	1	2,9	45	36,9	12	9,8	11	52,4	-	
21q	2	5,9	15	44,1	9	7,4	47	38,5	5	23,8	9	42,9
22q	10	29,4	4	11,8	23	18,9	9	7,4	7	33,3	1	4,8

La comparación de las alteraciones entre los distintos subgrupos de respuesta a TPF mediante el test exacto de Fisher reveló que las pérdidas en 4p presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos ($p < 0,05$). Esta alteración está presente en el 67% de los tumores incluidos en el grupo TOX. De este modo, las pérdidas en 4p podrían tener una implicación en la toxicidad al régimen de QTI, TPF, siendo interesante su valoración como biomarcador. Además, se observó una tendencia a un mayor número de alteraciones genómicas de gran tamaño en el grupo TOX, sin llegar a presentar significación estadística.

3. Asociación de los cambios focales con la respuesta al régimen TPF

En análisis de cambios focales por subgrupos de respuesta permitió identificar un mayor número de alteraciones focales en el subgrupo TOX. Por el contrario, el subgrupo EE presentó menos cambios genómicos a este nivel. En el grupo TOX los cambios focales más recurrentes fueron ganancias en las regiones 3q28, 8q23.3, 8q24.21, 11q13.3 y 20q11.23, así como pérdidas en 3p12.3, 4p15.32, 3p14.2, 3p12.1 y 8p23.2. Por otra parte, en el grupo EE, las alteraciones observadas con una mayor frecuencia fueron ganancias en 3q28 y 11q13.3 y pérdidas en 9p21.3 y 11q25. En los casos con RC/RP, se identificaron con elevada recurrencia ganancias en 3q28, 8q24.1y 8q23.3, así como pérdidas en 3p12.1 y 3p12.3. La frecuencia de los distintos cambios focales detectados se presenta, tanto para la serie global como para los distintos subgrupos de respuesta, en la **Tabla 27**.

La comparación de la frecuencia en los cambios focales entre los distintos subgrupos de respuesta mediante el test exacto de Fisher permitió identificar alteraciones con diferencias estadísticamente significativas entre ellos ($p < 0,05$). Estas fueron las ganancias en 6q21, 7q21.3, 7q31.2, 8q24.21, 14q13.3, 15q26.3 y 20p12.2 y las pérdidas en 4p15.32, 4p15.31, 5q15.3, 6p24.3, 15q22.31, 2p23.3, 2q22.1, 4q22.1 y 1q21.2 (**Tabla 27**).

Dado que el análisis de cambios focales reveló la existencia de regiones en 4p con pérdidas diferenciales entre los subgrupos, se realizó un análisis a nivel génico en este brazo cromosómico. Se identificaron 142 genes alterados de manera estadísticamente significativa, en cuanto a frecuencia, entre los distintos subgrupos de respuesta, aplicando el test exacto de Fisher ($p < 0,05$).

Tabla 27. Cambios focales significativos identificados tanto en la serie global como en los distintos subgrupos (TOX, EE y RC/RP). Se señalan aquellas regiones con diferencias significativas en la frecuencia al comparar los subgrupos de respuesta.

CNA	Región	q-valor	TOX n=21	EE n=34	RC/RP n=122	Total n= 177	p-valor
Amplificación	1q21.3	0,000037169	66,67	47,06	60,66	59,09	
	3q28	5,4631E-33	85,71	79,41	94,26	90,91	
	5p13.1	0,015312	61,90	44,12	60,66	57,95	
	6q21	0,023366	57,14	17,65	40,16	38,07	p<0.05
	7p11.2	1,667E-43	71,43	55,88	65,57	64,77	
	7q21.3	1,3049E-09	61,90	32,35	41,80	42,61	p<0.05
	7q31.2	5,5345E-09	76,19	35,29	52,46	52,27	p<0.05
	8q23.3	7,1228E-07	85,71	61,76	78,69	76,70	
	8q24.21	3,0631E-15	85,71	58,82	79,51	76,70	p<0.05
	10q11.22	2,7187E-08	52,38	29,41	38,52	38,64	
	11q13.3	9,7164E-180	85,71	79,41	72,13	75,57	
	12p11.22	0,0044327	52,38	61,76	54,92	56,25	
	12q21.33	0,051674	52,38	38,24	52,46	50,00	
	14q13.3	7,8486E-07	57,14	29,41	42,62	42,05	p<0.05
	15q26.3	0,01584	61,90	55,88	36,89	43,75	p<0.05
	17q22	0,035692	52,38	47,06	52,46	51,70	
	18p11.31	1,7288E-08	52,38	50,00	40,98	44,32	
	20p12.2	0,028111	71,43	32,35	44,26	45,45	p<0.05
	20q11.23	0,092245	80,95	58,82	57,38	60,80	
Deleción	3p26.3	0,000027708	71,43	58,82	68,03	67,05	
	3p14.2	7,0764E-17	85,71	61,76	76,23	75,00	
	3p12.3	8,5779E-16	90,48	64,71	78,69	77,84	
	3p12.1	5,6998E-17	85,71	67,65	84,43	81,82	
	4p15.32	0,00045947	90,48	32,35	59,02	57,95	p<0.05
	4p15.31	0,0011669	76,19	32,35	59,84	56,82	p<0.05
	5q13.3	0,0056318	57,14	26,47	52,46	48,30	p<0.05
	5q31.3	0,042195	57,14	41,18	45,08	46,02	
	6p24.3	0,000007208	52,38	29,41	22,95	27,84	p<0.05
	8p23.2	2,3777E-26	80,95	61,76	58,20	61,93	
	8p11.22	4,3723E-28	66,67	38,24	38,52	42,05	
	9p21.3	4,5361E-137	76,19	73,53	64,75	68,18	
	10p11.21	0,0019803	52,38	38,24	31,97	35,80	
	11q22.1	5,5057E-06	61,90	58,82	49,18	52,84	
	11q25	1,1016E-06	66,67	70,59	57,38	61,36	
	13q11	1,7465E-13	57,14	44,12	55,74	53,98	
	15q12	1,8303E-06	52,38	26,47	38,52	38,07	
	15q22.31	0,000008632	52,38	26,47	45,08	42,61	p<0.05
	17p13.1	0,0053059	47,62	55,88	43,44	46,59	
	18q21.31	0,000019583	42,86	58,82	47,54	49,43	
	18q23	0,0085411	47,62	58,82	49,18	51,14	
	21q22.2	6,4974E-06	42,86	52,94	45,90	47,16	
	2p23.3	0,0014545	38,10	8,82	27,05	25,00	p<0.05
	2q22.1	0,000033908	42,86	2,94	21,31	20,45	p<0.05
	4q22.1	0,10237	33,33	8,82	20,49	19,89	p<0.05
	1q21.2	9,0832E-06	19,05	2,94	20,49	17,05	p<0.05

Con el objetivo de identificar los procesos celulares afectados por estos 142 genes afectados por ganancias y pérdidas genómicas de manera diferencial entre los subgrupos de respuesta, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional con la herramienta WebGestalt, seleccionando la base de datos de referencia KEGG. Así, se pudieron identificar las vías de señalización sobrerrepresentadas en este conjunto de genes de manera significativa ($FDR < 0,05$) (**Figura 57**).

La mayor parte de estas vías de señalización participan en el metabolismo celular, que parece ser determinante en la respuesta al régimen TPF. Algunos de los genes implicados en estos procesos que se han identificado con alteraciones diferenciales son *EVC* y *EVC2*, asociados con la vía de señalización de Sonic-Hedgehog y *CTBP1* y *RBPJ*, implicados en la vía de señalización de Notch. Además, también se detectaron entre los diferencialmente alterados algunos genes que participan en la respiración mitocondrial, así como genes que participan en la glicólisis, lo que sugiere que el mecanismo por el que las células generan energía (ATP) puede ser clave en la respuesta al tratamiento.

Por otro lado, realizando un análisis de enriquecimiento funcional con estos 142 genes y seleccionando la categoría de componentes celulares, se determinó que la membrana celular estaba enriquecida ($FDR < 0,05$). Así, los receptores que regulan la entrada de moléculas en las células también parecen tener un papel relevante en la respuesta al régimen TPF.

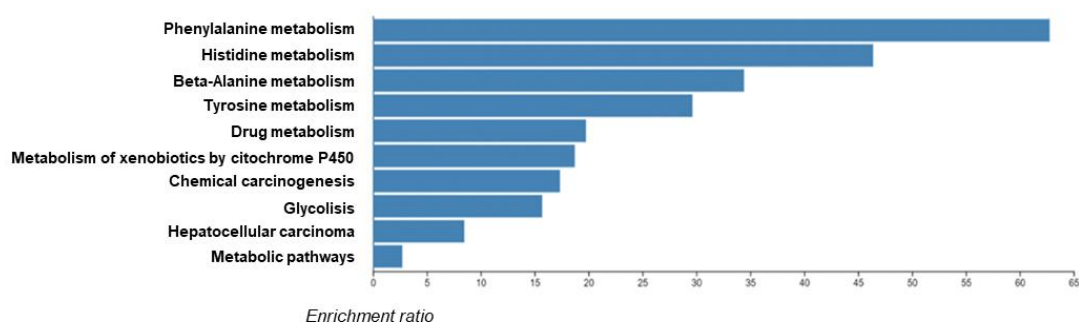


Figura 57. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes afectados por cambios focales de manera estadísticamente significativa entre los subgrupos de respuesta. El análisis se realizó con WebGestalt, seleccionando la base de datos de vías de señalización KEGG y mostrando aquellos procesos celulares sobrerrepresentados de manera significativa ($FDR < 0,05$).

Finalmente, se analizó la región en la que se encuentran el gen *ATG7* (3p25.3), en cada uno de los subgrupos de respuesta, a pesar de no existir diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de casos con alteración al comparar los 3 subgrupos entre sí (**Tabla 28**).

Un 64,41% de los tumores estudiados presentan pérdidas en la región donde se encuentra *ATG7*, la gran mayoría (62,71%) en heterocigosis. Esta alteración es más frecuente en los casos que responden al tratamiento o presentan toxicidad ante él frente a los casos con estabilización de la enfermedad. Por otra parte, el porcentaje de tumores con ganancias en esta región es muy pequeño en todos los casos.

Tabla 28. Alteraciones genómicas identificadas en la región donde se localiza *ATG7* en la serie global y en los distintos subgrupos (TOX, EE y RC/RP). Hom: homocigosis; het: heterocigosis.

Alteraciones en la región 3p25.3									
Alteración		Total		EE		RC/RP		TOX	
		Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Ganancias		8	4,52	2	5,88	4	3,28	2	9,52
Pérdidas	Hom	111	62,71	17	50,00	80	65,57	14	66,67
	Het	3	1,69	0	0,00	2	1,64	1	4,76
	Total	114	64,41	17	50,00	82	67,21	15	71,43

4. Determinación del estado del gen *ATG7* mediante PCR cuantitativa comparativa

Con el objetivo de continuar con el análisis de las alteraciones genómicas que afectan al gen *ATG7* en muestras de CECC se llevó a cabo un estudio mediante qPCR en 15 muestras tumorales procedentes de otra cohorte de pacientes, partiendo de DNA aislado a partir de muestra tumoral conservada en parafina y amplificando el exón 10 de la variante 1 del gen *ATG7* (**Figura 58**).

De las muestras analizadas, tan solo una de ellas, la muestra 11, correspondiente a un 6,7% de las muestras analizadas, presentó una delección heterocigota en *ATG7*. El resto de tumores no presentaron pérdidas que afecten al exón 10 de la variante 1 de este gen detectables mediante esta técnica. Este se trata de un estudio preliminar.

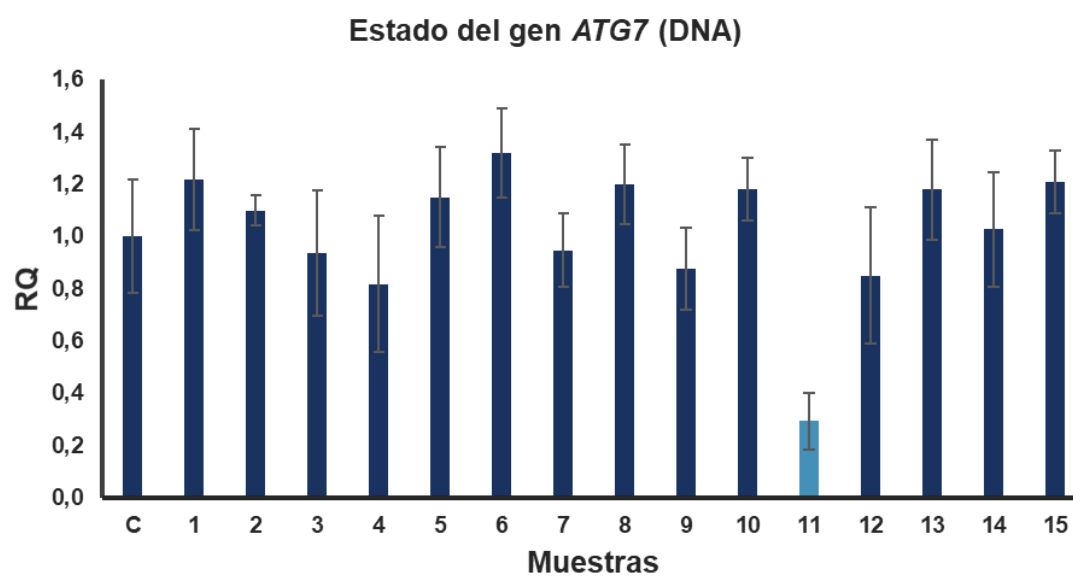


Figura 58. Determinación del estado del gen *ATG7* en una serie de 15 CECC mediante qPCR Se ha realizado una normalización respecto a una muestra control sin alteraciones en el gen *ATG7*. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas.

CAPÍTULO IV. Caracterización molecular y fenotípica de las líneas celulares de carcinoma escamoso y cuello resistentes a taxanos.

1. Caracterización de las alteraciones en el número de copias de las líneas celulares 32816 y 32816-R

Con el objetivo de determinar las alteraciones responsables de la resistencia y, dado que la línea celular 32816 fue establecida en el laboratorio y no disponíamos de datos publicados acerca de su caracterización molecular, se decidió realizar un estudio de aCGH tanto en la línea celular parental como en la resistente.

Este estudio permitió la identificación de CNA comunes en las dos líneas celulares, como ganancias en 3q, 9p, 16p, 20p, 20q, Yp e Yq y pérdidas en 3p, 4q, 12q y 18q. Entre las alteraciones diferenciales entre las líneas celulares 32816 y 32816-R destacan la pérdida de una región de gran tamaño en el brazo q del cromosoma 7 así como la amplificación de la región adyacente detectada únicamente en la línea celular 32816-R. Además, en la línea celular 32816 se observó la presencia de un isocromosoma 8 que se pierde en la línea celular 32816-R (**Figura 59**).

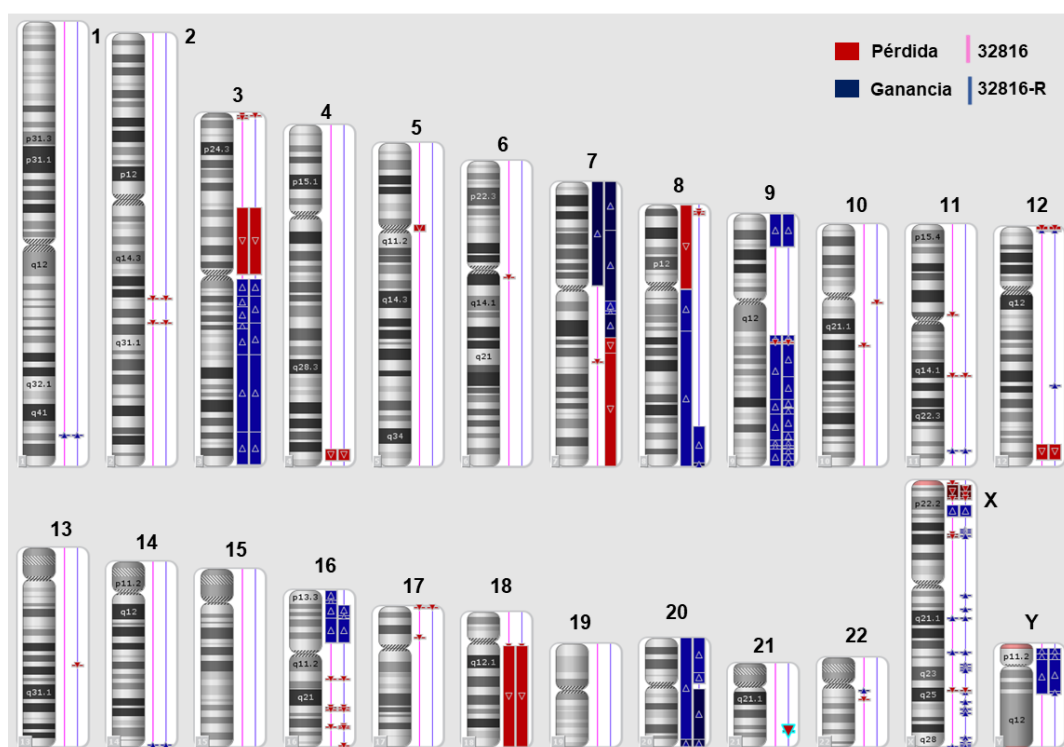


Figura 59. Ganancias y pérdidas de material genético detectadas en cada uno de los cromosomas de las líneas celulares 32816 y 32816-R mediante aCGH. La línea celular 32816 se representa en rosa y la línea celular 32816-R en azul. Las ganancias de material genético se representan en azul y las pérdidas en rojo.

2. Análisis de los cambios de expresión en las líneas celulares resistentes a taxanos

2.1. Estudio del transcriptoma mediante *microarrays* de expresión

La caracterización molecular de la línea celular 32816-R se completó con un estudio del transcriptoma mediante *microarrays* de expresión. Se analizaron los genes que presentaban cambios de expresión entre las líneas celulares 32816 y 32816-R con un *fold change* (FC) mayor que 2 o menor que -2 y un p-valor < 0,05. Siguiendo estos criterios se identificaron 2804 genes con una expresión diferencial significativa entre las líneas celulares 32816 y 32816-R, 1333 infraexpresados y 1471 sobreexpresados en la línea celular 32816-R.

El análisis de enriquecimiento funcional de estos 2804 genes con la herramienta WebGestalt permitió determinar los procesos biológicos, los componentes celulares y las funciones moleculares más desregulados entre ambas líneas celulares (**Figura 60**). El proceso celular más afectado fue el metabolismo, mientras que el componente celular implicado con una mayor recurrencia fue la membrana celular y la función molecular con mayor modificación la unión a proteínas.

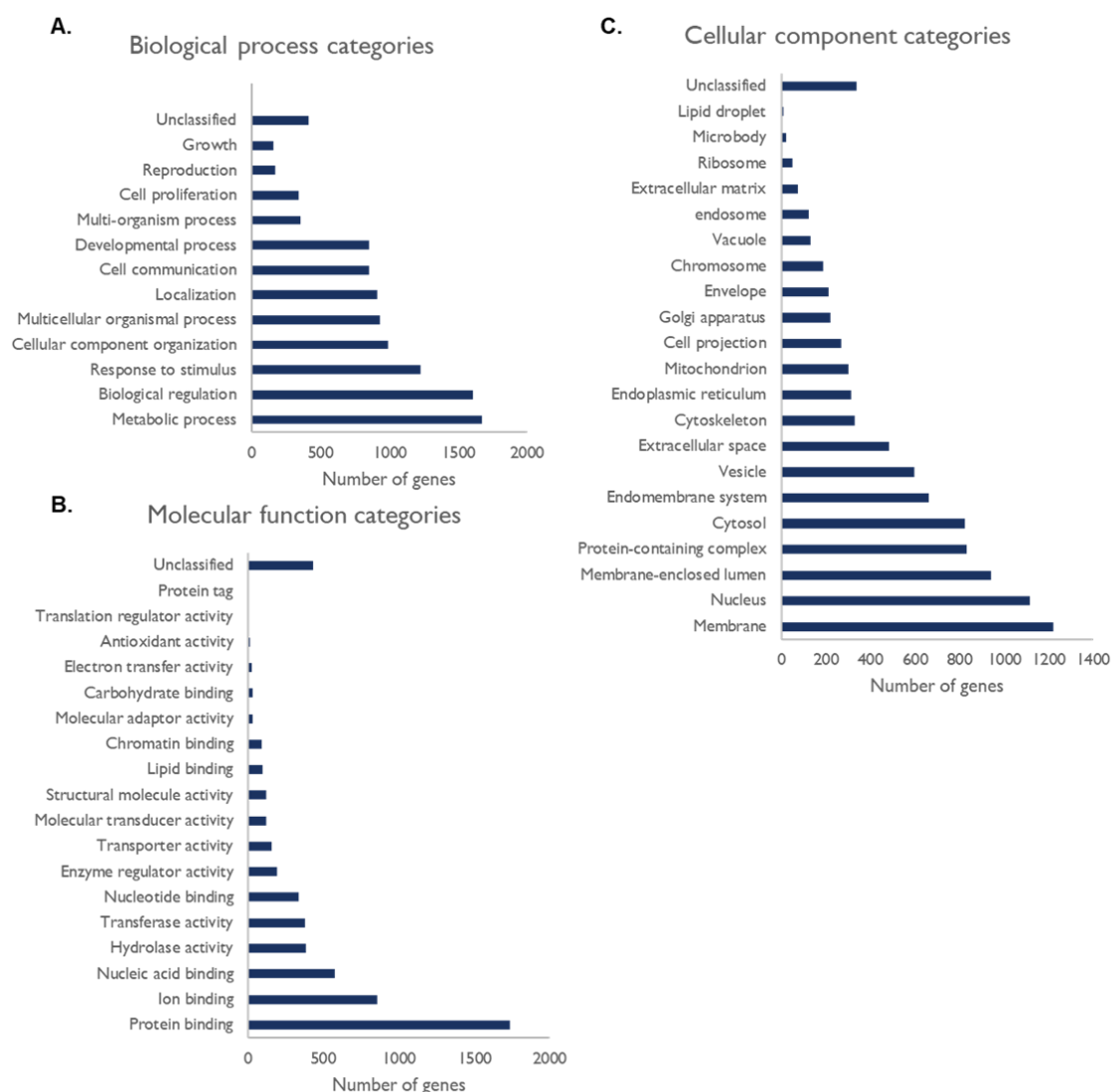
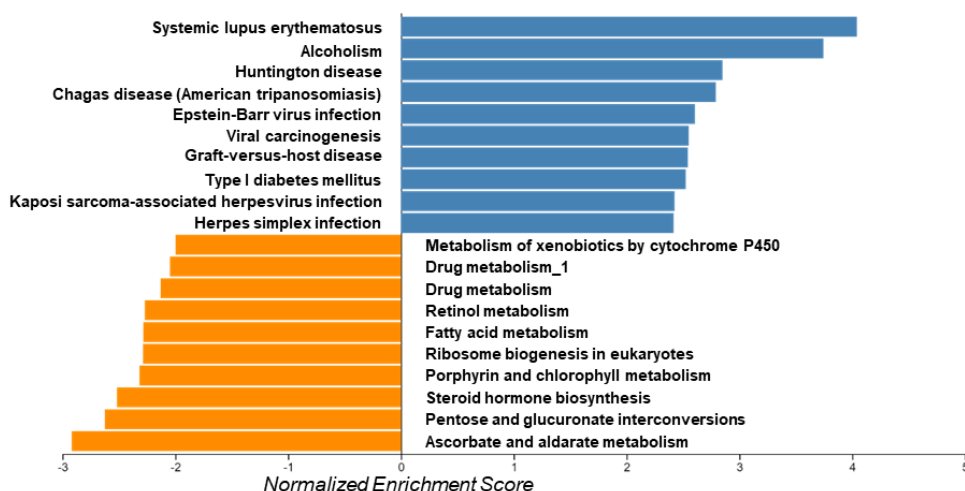


Figura 60. Asociación de los genes con expresión diferencial significativa entre las líneas celulares 32816 y 32816-R con A. procesos biológicos; B. funciones moleculares; C. componentes celulares. Los gráficos se obtuvieron con la herramienta WebGestalt.

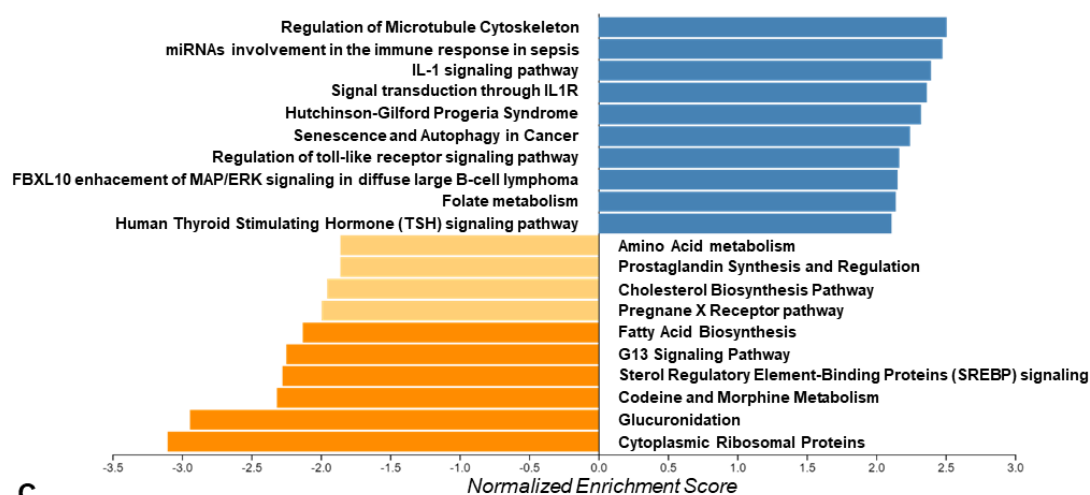
Además, el análisis de estos 2804 genes con la herramienta WebGestalt permitió la identificación de vías de señalización alteradas en la línea celular 32816-R, empleando distintas bases de datos (KEGG, WikiPathway y WikiPathway cancer) (**Figura 61**).

Aunque las vías de señalización identificadas difieren según la base de datos de referencia empleada, algunos procesos que parecen tener importancia en el desarrollo de resistencia a taxanos teniendo en cuenta el conjunto de los análisis realizados son: la señalización mediada por interleucinas, el metabolismo celular, la regulación del citoesqueleto por los microtúbulos, la autofagia y la senescencia, la respuesta al daño en el DNA, el ciclo celular, las vías de señalización de Wnt y TGF- β y la transición epitelio-mesénquima.

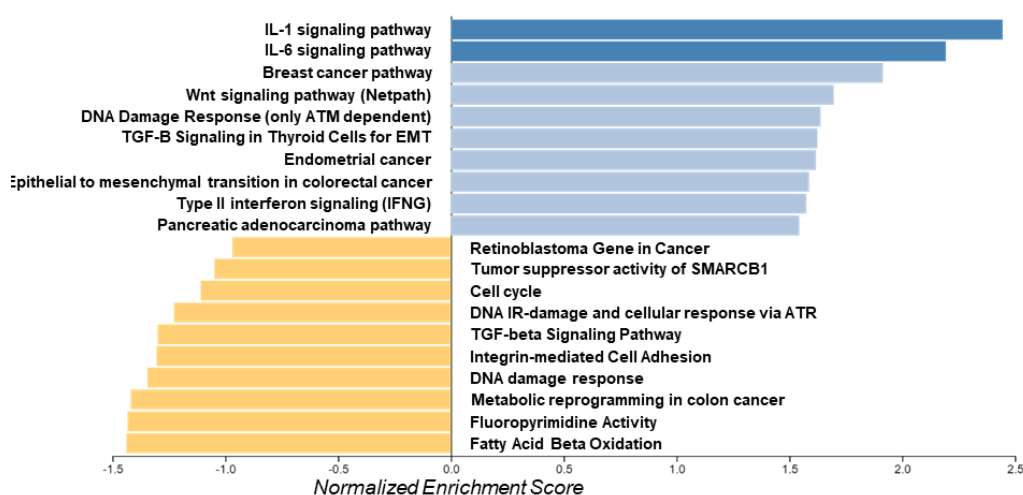
A.



B.



C.



■ ■ FDR ≤ 0,05
■ ■ FDR > 0,05

Figura 61. Vías de señalización desreguladas asociadas a la adquisición de resistencia a taxanos en la línea celular 32816-R. Se representan las 20 vías de señalización con mayor asociación con el conjunto de genes desregulados de manera significativa según el resultado del estudio del transcriptoma atendiendo al análisis GSEA con distintas bases de datos: A. KEGG; B. Wikipathway; C. Wikipathway cancer.

Posteriormente, se procedió a seleccionar los 20 genes con una expresión diferencial con mayor significación estadística en la línea celular 32816-R y realizar una búsqueda bibliográfica para determinar su potencial implicación en la resistencia a taxanos (**Tabla 29**). De estos 20 genes, 17 presentaban una sobreexpresión en la línea celular 32816-R y 3 se encontraban infraexpresados.

Tabla 29. Genes con la expresión diferencial con mayor significación estadística entre las líneas celulares 32816 y 32816-R. En verde se muestran los genes sobreexpresados en la línea celular 32816 RXT y el rojo los infraexpresados. Los genes se encuentran ordenados en función del tipo de alteración en la línea celular 32816-R (sobreexpresión o infraexpresión) y de mayor a menor significación estadística.

Gen	Cromosoma	p-valor	Intensidad de fluorescencia 32816 (log2)	Intensidad de fluorescencia 32816-R (log2)
<i>ABCB1</i>	7	6,63E-12	4,13	12,44
<i>GALNT14</i>	2	8,50E-12	4,1	11,46
<i>SPRR2A</i>	1	1,40E-11	6,00	12,24
<i>SPRR2E</i>	1	7,76E-11	5,26	13,31
<i>CCL28</i>	5	1,06E-10	4,81	10,65
<i>PVRL3</i>	3	1,98E-10	2,81	8,45
<i>LY6D</i>	8	5,18E-10	7,06	12,65
<i>SPRR2D</i>	1	5,49E-10	6,64	14,38
<i>SPRR2B</i>	1	6,93E-10	6,78	12,16
<i>IGFL1</i>	19	8,01E-10	6,30	11,66
<i>SAA2</i>	11	1,45E-09	8,48	14,90
<i>ZDHHC2</i>	8	2,26E-09	4,18	8,82
<i>SGPP2</i>	2	2,61E-09	3,97	9,42
<i>ADD2</i>	2	3,07E-09	3,84	9,30
<i>AKAP12</i>	6	3,11E-09	4,15	7,57
<i>DEFB4B</i>	8	4,24E-09	3,45	8,05
<i>PRKD1</i>	14	5,42E-09	3,61	7,39
<i>DNAJC15</i>	13	1,48E-09	11,79	5,98
<i>KLK9</i>	19	2,45E-09	11,27	6,95
<i>FLRT3</i>	20	2,54E-09	9,49	4,82

De estos genes, se seleccionaron los genes *ABCB1* y *DNAJC15* para continuar su estudio posterior como candidatos a biomarcadores de respuesta a taxanos en CECC. *ABCB1* codifica MDR1, una bomba de expulsión de fármacos dependiente de ATP asociada a resistencia a múltiples drogas¹⁶⁹. *DNAJC15* codifica MCJ, una proteína que funciona como regulador negativo de la cadena transportadora de electrones en la respiración mitocondrial, que limita la producción de ATP²⁶⁸. De este modo, la

disminución de su expresión conduce a la producción de grandes cantidades de ATP, que puede ser usado por bombas de expulsión de fármacos como MDR1.

Entre los 2804 genes desregulados de manera significativa en la línea celular 32816-R se realizó una búsqueda dirigida de genes asociados previamente en la literatura con resistencia a taxanos en CECC¹³⁰ (**Tabla 30**). Además de la alteración de *ABCB1*, se observó una sobreexpresión significativa de los genes *BIRC5*, *FOXM1*, *NFKB1* y *TUBB3* y una infraexpresión significativa del gen *CYCS*, en la línea celular 32816-R. En el caso de *FOXM1*, el FC fue de 1,88, y en el caso de *BIRC5*, el FC fue de 1,62, de modo que no se continuó con la comprobación de estas alteraciones porque el FC no se encontraba dentro de los parámetros establecidos ($FC > 2$ o $FC < -2$). Los demás genes presentaban una alteración de la expresión en el sentido contrario a lo descrito en la literatura, por lo que también se descartaron como candidatos a estar implicados en el mecanismo de resistencia a taxanos de esta línea celular.

Tabla 30. Genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares 32816 y 32816-R asociados a resistencia a taxanos en la literatura. En verde se muestran los genes sobreexpresados en la línea celular 32816 RXT y el rojo los infraexpresados. Los genes se encuentran ordenados en función del tipo de alteración en la línea celular 32816-R (sobreexpresión o infraexpresión) y de mayor a menor significación estadística.

Gen	Cromosoma	p-valor	Intensidad de fluorescencia 32816 (log2)	Intensidad de fluorescencia 32816-R (log2)
<i>ABCB1</i>	7	6,63E-12	4,13	12,44
<i>CASP9</i>	1	2,10E-04	6,28	7,73
<i>TUBB3</i>	16	3,90E-04	6,86	9,55
<i>NFKB1</i>	4	7,01E-04	10,63	11,87
<i>BIRC5</i>	17	1,26E-02	10,28	10,98
<i>FOXM1</i>	12	4,88E-02	11,99	12,91
<i>CYCS</i>	7	1,73E-04	14,76	13,68
<i>ABCC5</i>	3	2,67E-03	8,56	7,20
<i>RSF1</i>	11	8,80E-02	9,77	9,07

2.2. Análisis de los cambios de expresión diferenciales de las líneas celulares resistentes a taxanos

Para validar las alteraciones en la expresión identificadas en la línea celular 32816-R mediante *microarrays* de expresión, se diseñaron oligonucleótidos específicos para amplificar el cDNA de los genes de interés mediante RT-qPCR. Se compararon los

niveles de expresión de los genes *CYCS*, *TUBB3*, *NFKB1*, *DNAJC15* y *ABCB1* entre las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos (**Figura 62**). Se confirmó la sobreexpresión de los genes *TUBB3*, *NFKB1* y *ABCB1* y la infraexpresión de *CYCS* y *DNAJC15* en la línea celular 32816-R. Sin embargo, en la línea celular CAL33-R únicamente se detectó la sobreexpresión del gen *ABCB1* y la infraexpresión del gen *DNAJC15*. Además, se identificó una sobreexpresión del gen *CYCS* en la línea celular CAL33-R a diferencia de lo observado en la línea celular 32816-R.

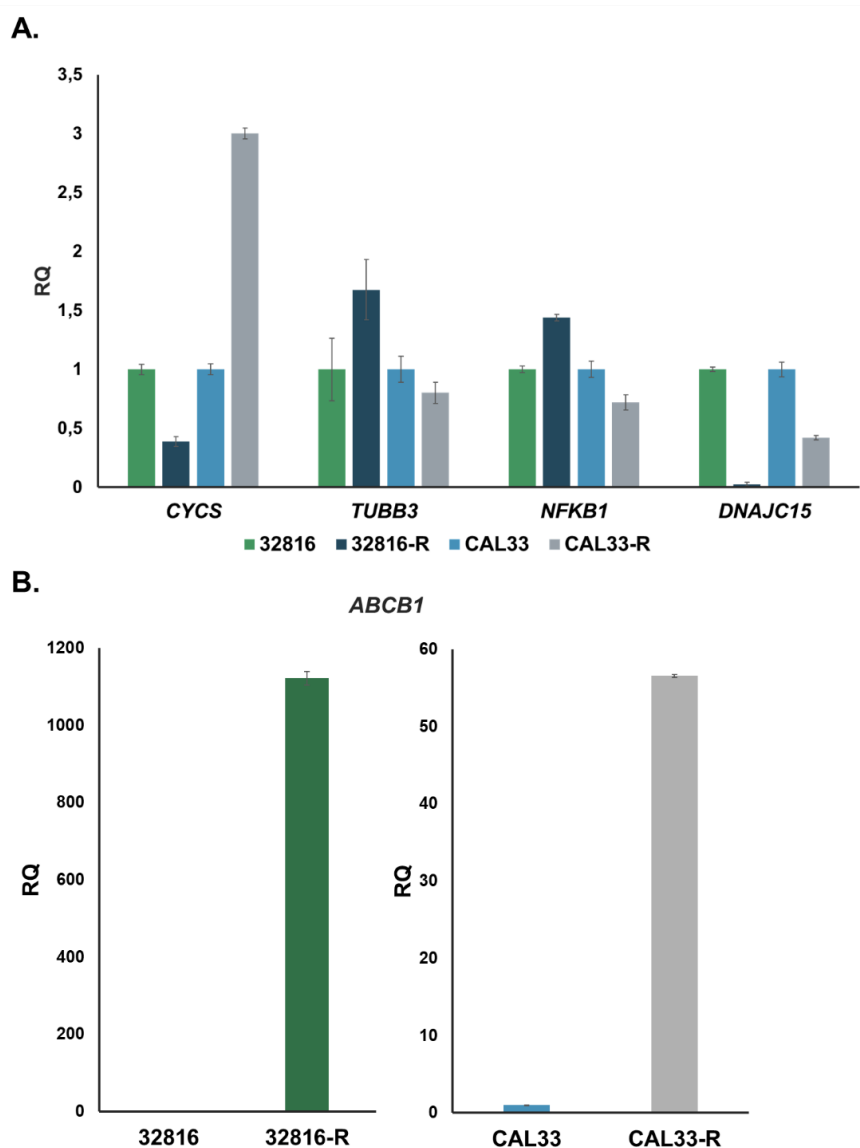


Figura 62. Comprobación de las alteraciones de expresión entre las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos mediante qPCR. A. Comparación de los niveles de expresión de los genes *CYCS*, *TUBB3*, *NFKB1* y *DNAJC15* entre las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos B. Comparación de los niveles de expresión del gen *ABCB1* entre las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos. Se realizó una normalización respecto a los niveles de expresión de los genes en la línea celular parental correspondiente en cada caso (32816 y CAL33). Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas.

Las alteraciones identificadas en *ABCB1* y *DNAJC15* en las líneas celulares resistentes a taxanos se confirmaron a nivel proteico mediante *western blot* (**Figura 63**).

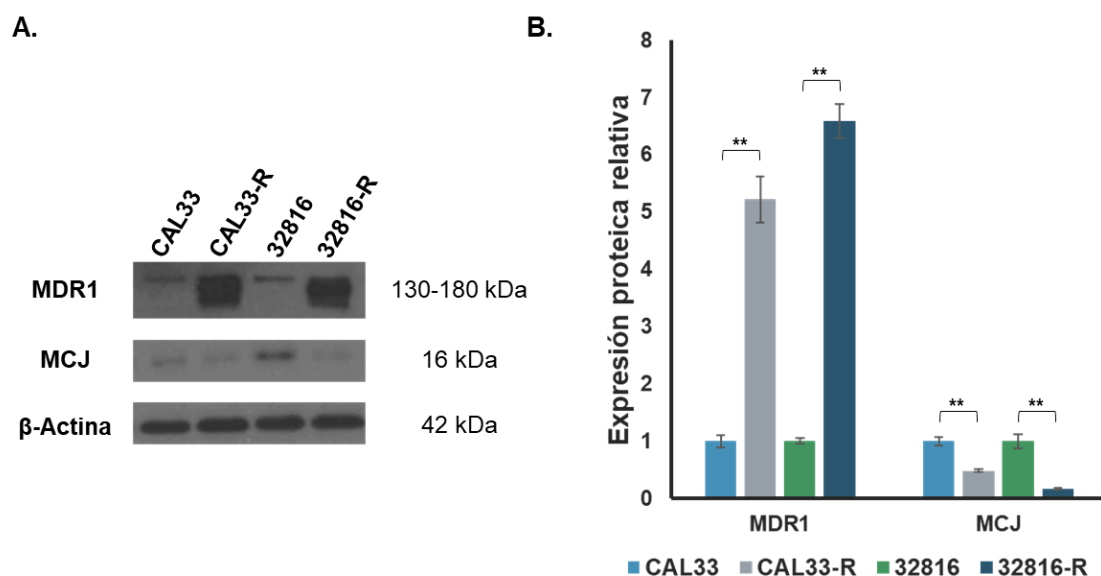


Figura 63. Niveles de expresión proteica de MDR1 y MCJ en las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos. A. Niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*. B. Cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*, normalizados frente a la expresión de la β -Actina como control endógeno y frente a las líneas celulares parentales como muestras de referencia. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas (**: p-valor < 0,01).

3. Reversión de la resistencia a taxanos mediante el tratamiento con verapamilo

Tras comprobar la sobreexpresión de MDR1 en las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos, se decidió determinar si esta alteración era esencial para el mantenimiento de la resistencia. Para ello, se empleó una dosis no citotóxica de verapamilo, un inhibidor los canales de calcio, que inhibe la función transportadora de la bomba de expulsión de fármacos MDR1, y se analizó la respuesta a paclitaxel y docetaxel mediante un ensayo de apoptosis por citometría de flujo (**Figura 64**). A las dos dosis empleadas de paclitaxel y docetaxel se observó una reversión de la resistencia en las células resistentes tratadas simultáneamente con verapamilo, recuperando los niveles de sensibilidad de las líneas celulares parentales, tanto en el caso de las células 32816 como de las CAL33.

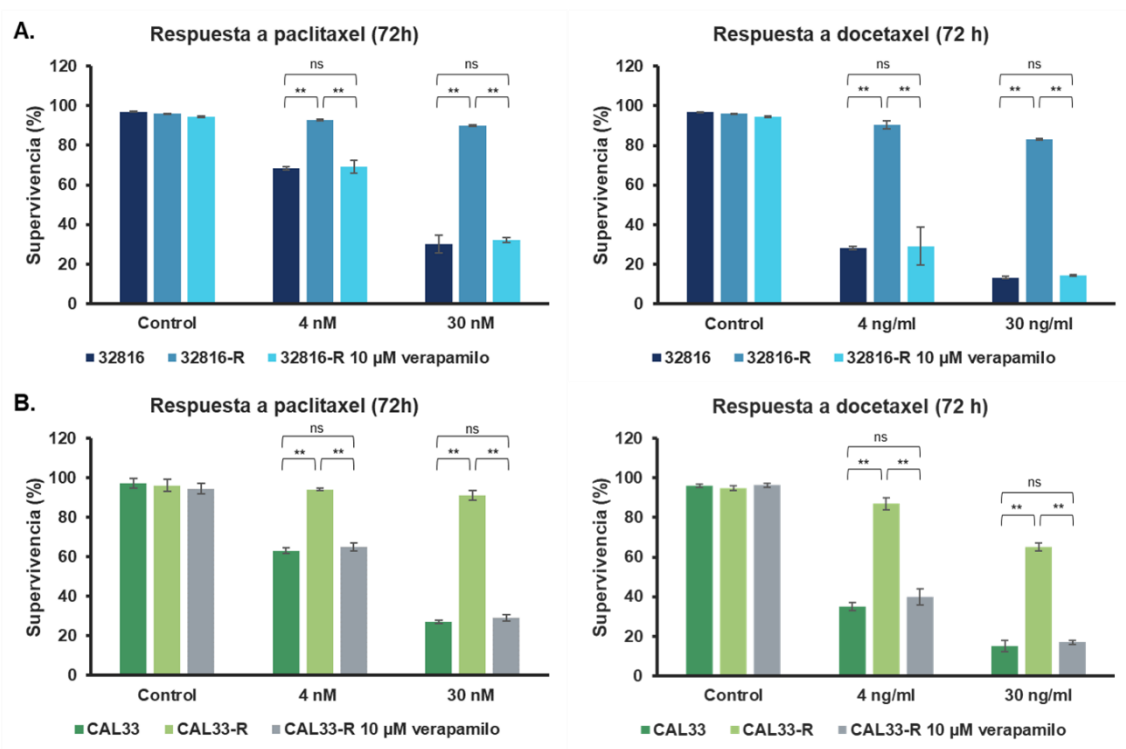


Figura 64. Reversión de la resistencia a taxanos tras el tratamiento con verapamilo en las líneas celulares 32816 (A) y CAL33 (B), determinada mediante ensayo de apoptosis por citometría de flujo. Se emplearon dos dosis de paclitaxel y docetaxel a un tiempo de 72 horas. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas independientes (**: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

4. Reversión de la resistencia a taxanos mediante la restauración de la expresión de MCJ

Con el fin de determinar si la disminución de la expresión de *DNAJC15* era necesaria para el mantenimiento de la resistencia a taxanos en las líneas celulares de CECC, se restableció su expresión en la línea celular 32816-R. Para ello, se empleó el vector pLVX-puro, al que se le insertó el cDNA de *DNAJC15*, dando lugar al vector pLVX-DNAJC15. En paralelo, se infectaron las células 32816-R con el vector pLVX sin inserto, como control. Posteriormente, se analizó mediante *western blot* la expresión de MCJ, la proteína codificada por *DNAJC15*, comprobándose que la línea celular 32816-R pLVX-DNAJC15 presentaba unos niveles de expresión de la proteína MCJ significativamente mayores que la línea celular 32816-R pLVX y también que la línea celular parental (Figura 65).

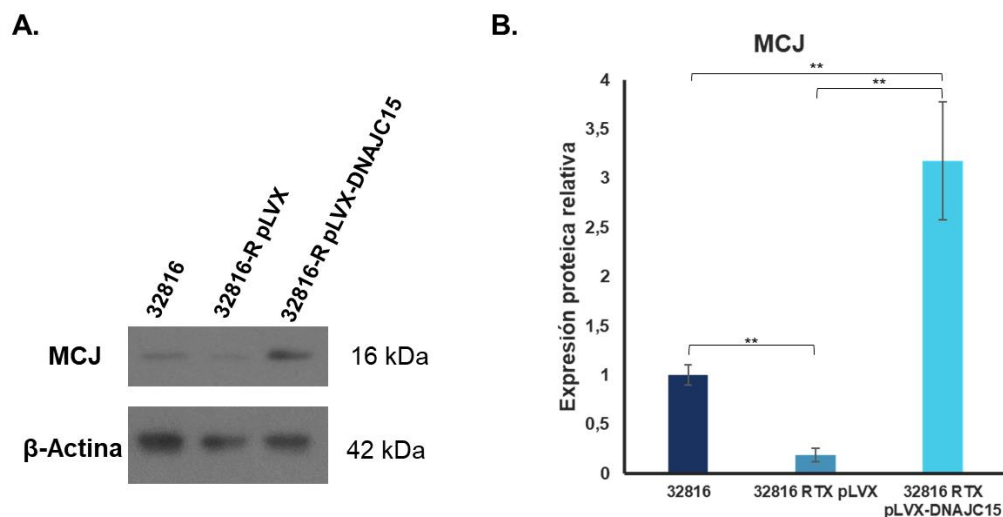


Figura 65. Niveles de expresión proteica de MCJ en las líneas celulares 32816, 32816-R pLVX y 32816-R pLVX-DNAJC15. A. Niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*. B. Cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*, normalizados frente a la expresión de la β-Actina como control endógeno y frente a la línea celular 32816 como muestra de referencia. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas (**: p-valor < 0,01).

Tras esta comprobación, se analizó si el aumento de la expresión de *DNAJC15* en la línea celular 32816-R restablecía la sensibilidad de esta línea celular a paclitaxel y docetaxel, mediante un ensayo de apoptosis por citometría de flujo (**Figura 66**). Mediante este ensayo, se observó una reversión significativa de la resistencia en esta línea celular. Sin embargo, la línea celular parental mostró una mayor sensibilidad, salvo en el caso de la mayor dosis de docetaxel, en el que la línea celular parental 32816 y la línea celular 32816-R pLVX-MCJ mostraron una respuesta muy similar.

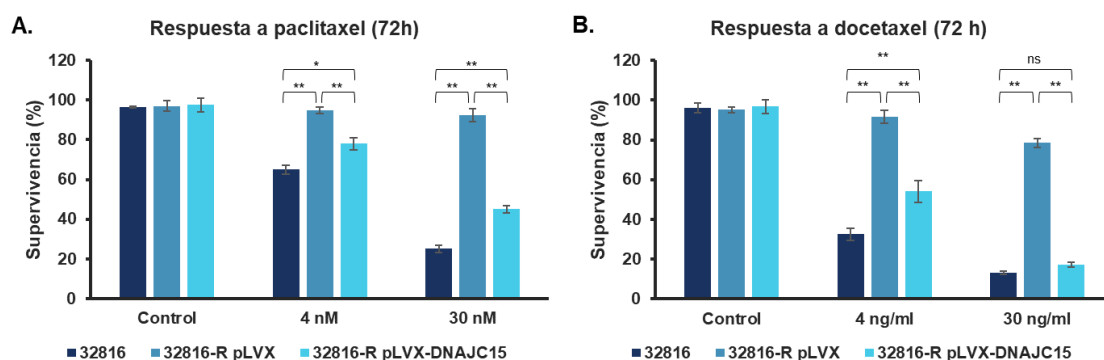


Figura 66. Reversión de la resistencia a taxanos en la línea celular 32816 con sobreexpresión de *DNAJC15*, determinada mediante ensayo de apoptosis por citometría de flujo. Se emplearon dos dosis de paclitaxel y docetaxel a un tiempo de 72 horas. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas independientes (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

5. Análisis de la capacidad proliferativa de las líneas celulares resistentes a taxanos

Con el objetivo de caracterizar el fenotipo de las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos, se determinó su capacidad proliferativa mediante un ensayo de viabilidad MTT (**Figura 67**). Se observó una disminución significativa de la proliferación tanto a 24 como a 48 horas en las dos líneas celulares resistentes a taxanos respecto a las respectivas líneas celulares de origen.

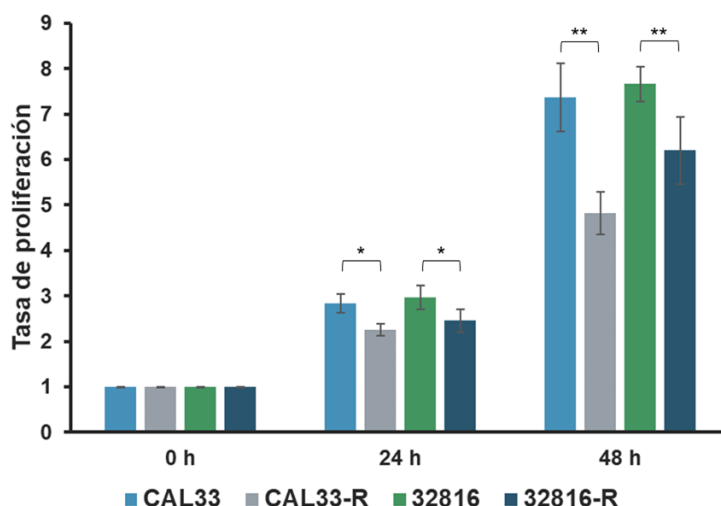


Figura 67. Tasa de proliferación de las líneas celulares parentales (CAL33 y 32816) y resistentes a taxanos (CAL33-R y 32816-R) determinada mediante un ensayo de viabilidad celular. Se realizó una normalización respecto al tiempo 0 h para cada línea celular. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas independientes (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01).

6. Identificación de alteraciones en el número de copias en los genes *ABCB1* y *DNAJC15* en muestras tumorales

Se analizaron las regiones 7q21.12, donde se localiza el gen *ABCB1*, y 13q14.11, donde se localiza el gen *DNAJC15*, en las 177 muestras de CECC incluidas en el estudio de aCGH descrito previamente. Se determinó la frecuencia de las alteraciones que afectan a estos genes en la serie global y los distintos subgrupos de respuesta al tratamiento TPF (**Tabla 31**).

En la región 7q21.12 se encontraron principalmente ganancias (un 35,59% en la serie global). Cabe destacar que en el grupo de pacientes que presentó toxicidad al tratamiento se observó una mayor frecuencia de esta alteración, detectando así un 52,38% de casos con ganancia en *ABCB1*.

En cuanto a *DNAJC15*, un 41,81% de los pacientes presentaron pérdidas de material genético en la región en la que se localiza este gen, mientras que el porcentaje de casos con ganancias es mínimo. En el subgrupo de pacientes con estabilización de la enfermedad se observó un ligero descenso en el porcentaje de casos con esta alteración, en comparación con el resto de subgrupos.

Tabla 31. Alteraciones genómicas identificadas en la región donde se localizan los genes *ABCB1* y *DNAJC15* en la serie global y en los distintos subgrupos de respuesta al régimen TPF (TOX, EE y RC/RP). TOX: toxicidad; EE: estabilización de la enfermedad; RC/RP: respuesta completa/respuesta parcial.

Región	Gen	Alteración	Total		EE		RC/RP		TOX	
			Casos	%	Casos	%	Casos	%	Casos	%
7q21.12	<i>ABCB1</i>	Ganancias	63	35,59	9	26,47	43	35,25	11	52,38
		Pérdidas	17	9,60	4	11,76	12	9,84	1	4,76
13q14.11	<i>DNAJC15</i>	Ganancias	17	9,60	4	11,76	10	8,20	3	14,29
		Pérdidas	74	41,81	10	29,41	55	45,08	9	42,86

7. Análisis de la capacidad migratoria de las líneas celulares resistentes a taxanos

Para comparar las alteraciones en la capacidad migratoria de las células de CECC resistentes a taxanos se realizó un ensayo de cierre de herida. Se monitorizó el proceso y se analizaron las imágenes obtenidas cada 5 horas hasta que la herida se cerró por completo en todas las líneas celulares. Se definió el área libre al inicio y se calculó el porcentaje de área ocupada a cada uno de los tiempos (**Figura 68**).

Se observó un aumento de la capacidad migratoria significativo en las líneas celulares resistentes a taxanos respecto a las líneas celulares parentales, siendo este más marcado en el caso de la línea celular 32816-R. En este caso, a 15 horas se observó un cierre total de la herida, mientras que, en la línea celular parental, 32816, esto no ocurrió hasta las 25 horas.

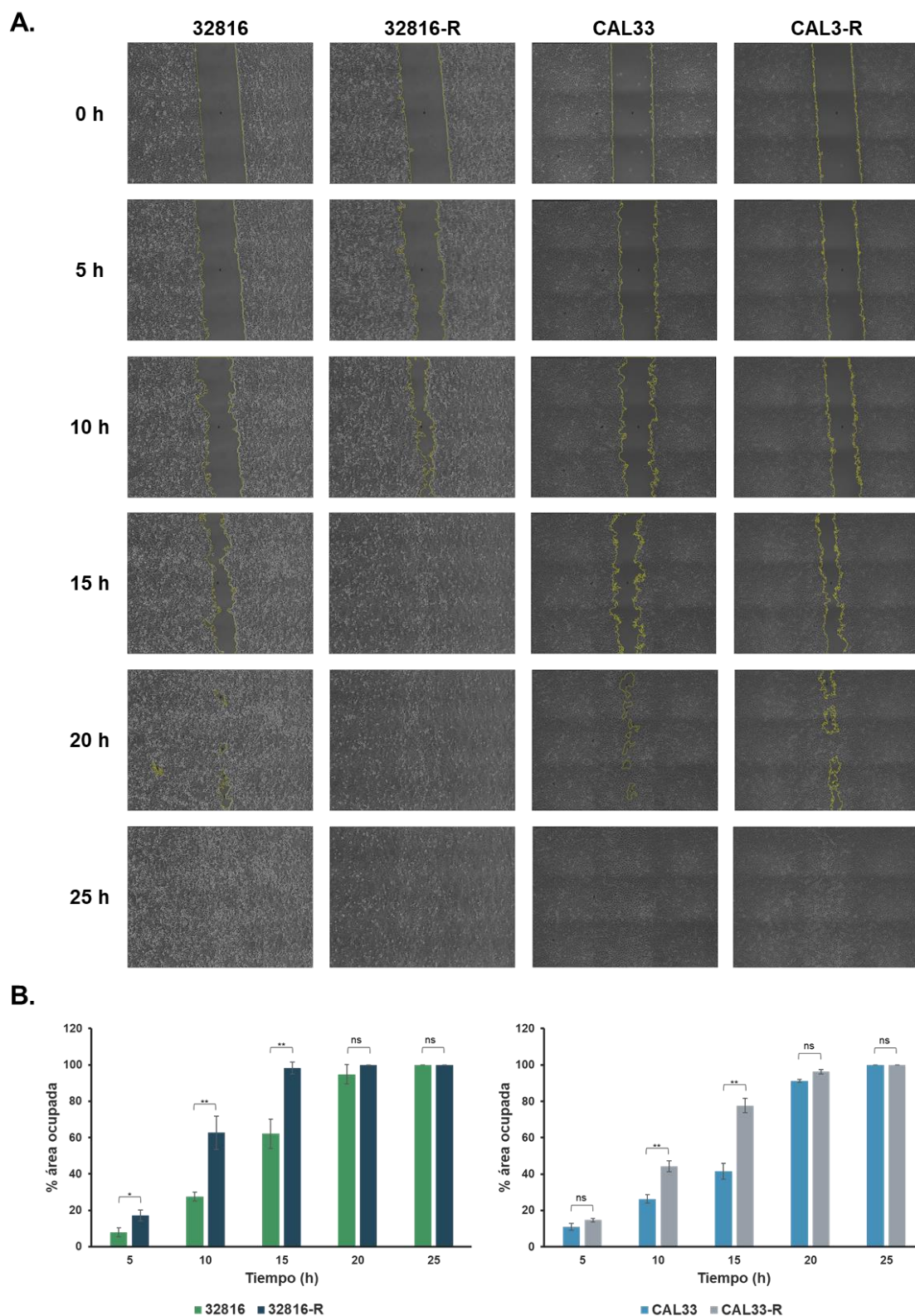


Figura 68. Análisis de la capacidad migratoria de las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos. A. Imágenes tomadas mediante microscopía a distintos tiempos. B. Cuantificación del porcentaje de área ocupada para cada tiempo y línea celular. Se realizó una normalización respecto al área libre a 0 h. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas independientes (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

Dada la alteración de la capacidad migratoria de las líneas celulares resistentes a taxanos, se decidió analizar los cambios de expresión en genes asociados a la transición epitelio-mesénquima identificados mediante *microarrays* de expresión, empleando el conjunto de genes incluidos en el término GO (Gene Ontology) “epithelial to mesenchymal transition” (GO:0001837). Se identificaron 19 genes implicados en procesos migratorios con cambios de expresión diferenciales significativos (**Tabla 32**).

Tabla 32. Genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares 32816 y 32816-R implicados en la transición epitelio-mesénquima. En verde se muestran los genes sobreexpresados en la línea celular 32816 RXT y el rojo los infraexpresados. Los genes se encuentran ordenados en función del tipo de alteración en la línea celular 32816-R (sobreexpresión o infraexpresión) y de mayor a menor significación estadística. Se consideró un $FC > 2$ o $FC < -2$ y un $p\text{-valor} < 0,05$

Gen	Cromosoma	p-valor	Intensidad de fluorescencia 32816 (log2)	Intensidad de fluorescencia 32816-R (log2)
<i>LEF1</i>	4	5,78E-08	6,60	9,11
<i>OLFM1</i>	9	4,95E-07	3,92	6,70
<i>MSX2</i>	5	1,06E-05	6,29	7,11
<i>TBX3</i>	12	6,67E-05	5,61	7,49
<i>EPB41L5</i>	2	1,69E-04	9,80	10,96
<i>TGFBR3</i>	1	2,36E-04	4,75	5,85
<i>FAM83D</i>	20	4,79E-04	14,41	15,81
<i>PEF1</i>	1	1,22E-03	7,54	8,87
<i>EFNA1</i>	1	3,34E-03	7,43	8,57
<i>FGFR2</i>	10	9,12E-07	10,07	7,72
<i>SNAI2</i>	8	7,92E-05	14,10	12,23
<i>BMP2</i>	20	1,02E-04	8,42	6,51
<i>SLC39A10</i>	2	2,15E-04	10,55	8,02
<i>RTN4</i>	2	4,65E-04	6,99	5,85
<i>FLNA</i>	X	6,27E-04	11,33	10,21
<i>WNT5A</i>	3	8,29E-04	6,52	4,71
<i>EDN1</i>	6	1,22E-03	8,14	7,06
<i>HMGA2</i>	12	3,71E-03	7,05	5,86
<i>HEY1</i>	8	7,55E-03	7,96	5,55

8. Papel de las vesículas extracelulares en la resistencia a taxanos

Posteriormente, se caracterizaron las EVs liberadas por las células CAL33 y CAL33-R mediante distintas técnicas.

8.1. Caracterización de las vesículas extracelulares mediante microscopía electrónica de transmisión

Mediante TEM se comprobó el correcto aislamiento de las EVs tanto de 10K como de 100K liberadas por las células CAL33 y CAL33-R (**Figura 69**).

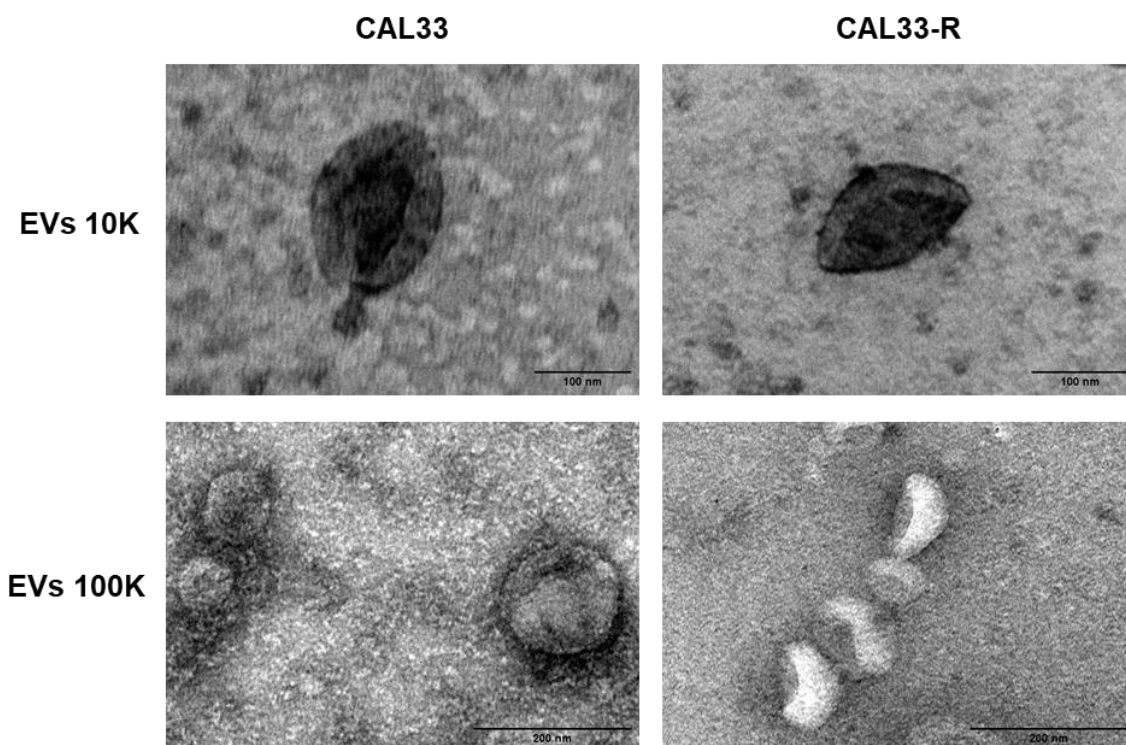


Figura 69. Imágenes obtenidas mediante TEM de las EVs procedentes de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R. El aislamiento de EVs se realizó por triplicado y en todos los casos se realizó la comprobación mediante TEM. Aquí se muestran imágenes representativas.

8.2. Caracterización de las vesículas extracelulares mediante análisis de rastreo de nanopartículas

Mediante NTA se determinó tanto el tamaño de las EVs como su concentración (**Figura 70**). Se observó una disminución significativa en el número de EVs liberadas por las células resistentes a taxanos, medida mediante el número de partículas por célula. En cuanto al tamaño, tal y como se esperaba, se determinó que las EVs de 10K presentaban un tamaño mayor que las 100K y que no existían diferencias estadísticamente significativas entre las células parentales y las resistentes a taxanos.

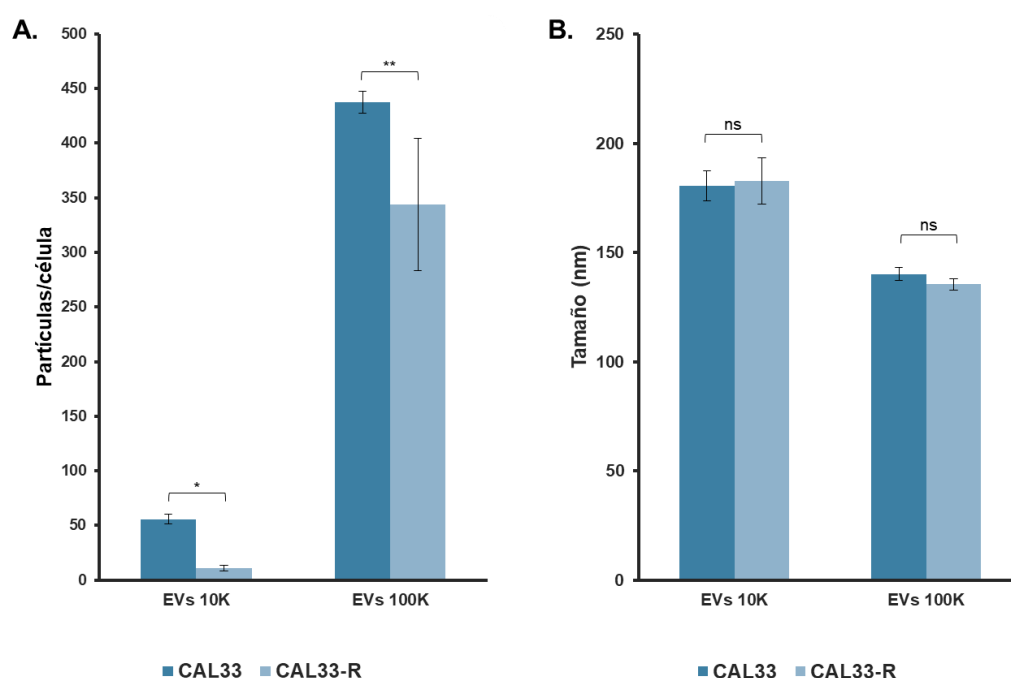


Figura 70. Representación gráfica de la concentración (A) y del tamaño (B) de las EVs liberadas por las líneas celulares CAL33 y CAL33-R determinada mediante NTA. El número de partículas se normalizó respecto al número de células para obtener la concentración de partículas. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas independientes (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

8.3. Determinación del contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante *western blot*

Se comprobó la presencia de distintos marcadores establecidos por las guías internacionales MISEV 2023 en las EVs de 100K procedentes de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R, detectándose todos ellos en ambos casos (**Figura 71**)¹⁹⁸.

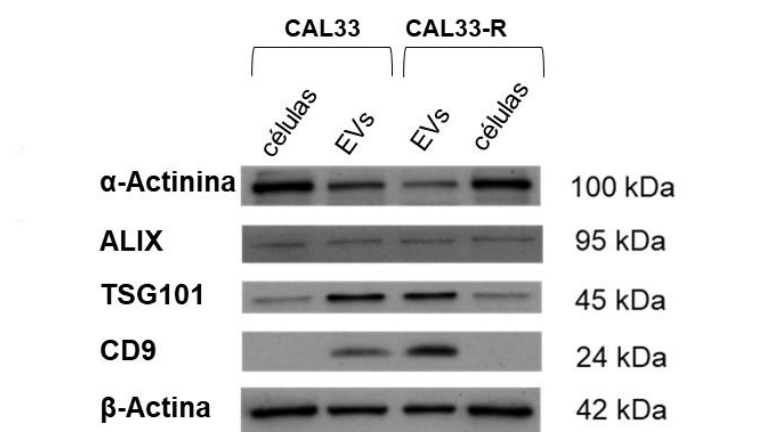


Figura 71. Detección de marcadores de EVs mediante *western blot*, tanto en las EVs como en las células de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R.

Posteriormente, se analizó la expresión proteica de MDR1 y MCJ (**Figura 72**). Se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de MDR1 tanto en las células como en las EVs de la línea celular CAL33-R, siendo esta proteína indetectable en el caso de las EVs procedentes de la línea celular parental. En cuanto a MCJ, se observó un aumento de expresión en las EVs liberadas por las células CAL33-R en comparación con la expresión intracelular.

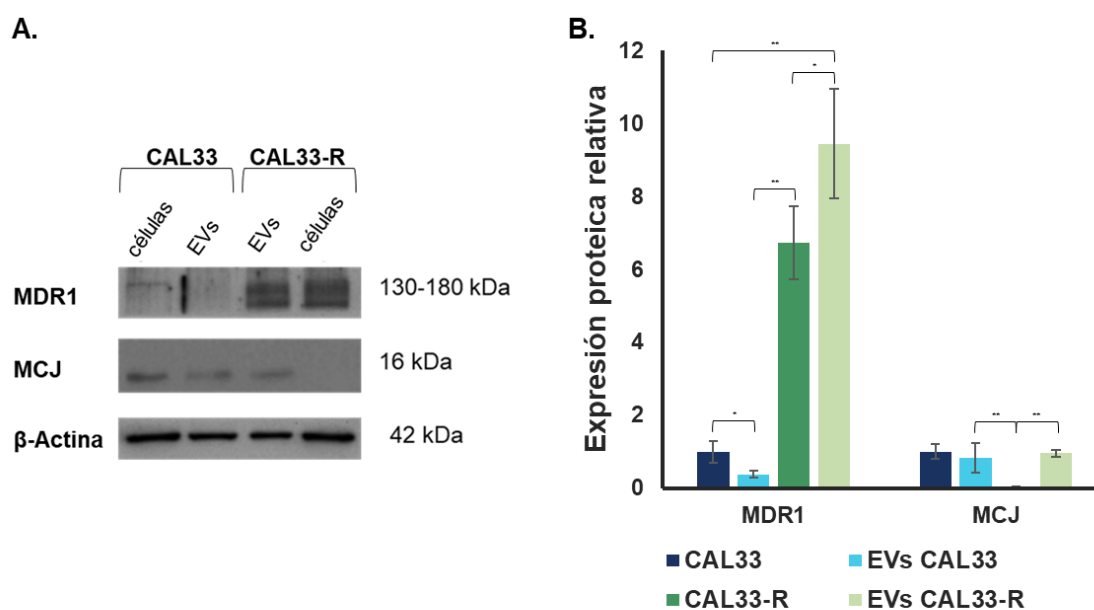


Figura 72. Detección de las proteínas MDR1 y MCJ tanto en las EVs como en las células de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R. A. Niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*. B. Cuantificación relativa de los niveles de expresión proteica detectados mediante *western blot*, normalizados frente a la β-actina como control endógeno y frente a las células parentales CAL33 como muestra de referencia. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó el test estadístico de la t de Student para comparar los niveles de expresión entre las células, entre las EVs y entre células y EVs de la misma línea celular. Se señalan las diferencias de expresión con significación estadística (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01).

8.4. Determinación del contenido proteico de las vesículas extracelulares mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

Con el objetivo de determinar las diferencias en el contenido proteico de las EVs procedentes de las células parentales y resistentes a taxanos se realizó un estudio del proteoma mediante LC-IMS/MS. Además, se comparó el contenido de las EVs con el contenido de las respectivas células de origen, así como las proteínas identificadas en las dos líneas celulares.

También se verificó la ausencia de contaminantes procedentes de estructuras co-aisladas distintas a las EVs (categoría 3 MISEV 2023)¹⁹⁸.

Además, mediante un análisis de enriquecimiento funcional se identificaron las vías de señalización con expresión diferencial entre las EVs liberadas por las células CAL33 y CAL33-R. Se empleó el conjunto de genes que codifican las proteínas detectadas únicamente en las EVs procedentes de la línea celular CAL33 o CAL33-R (**Figura 74**).

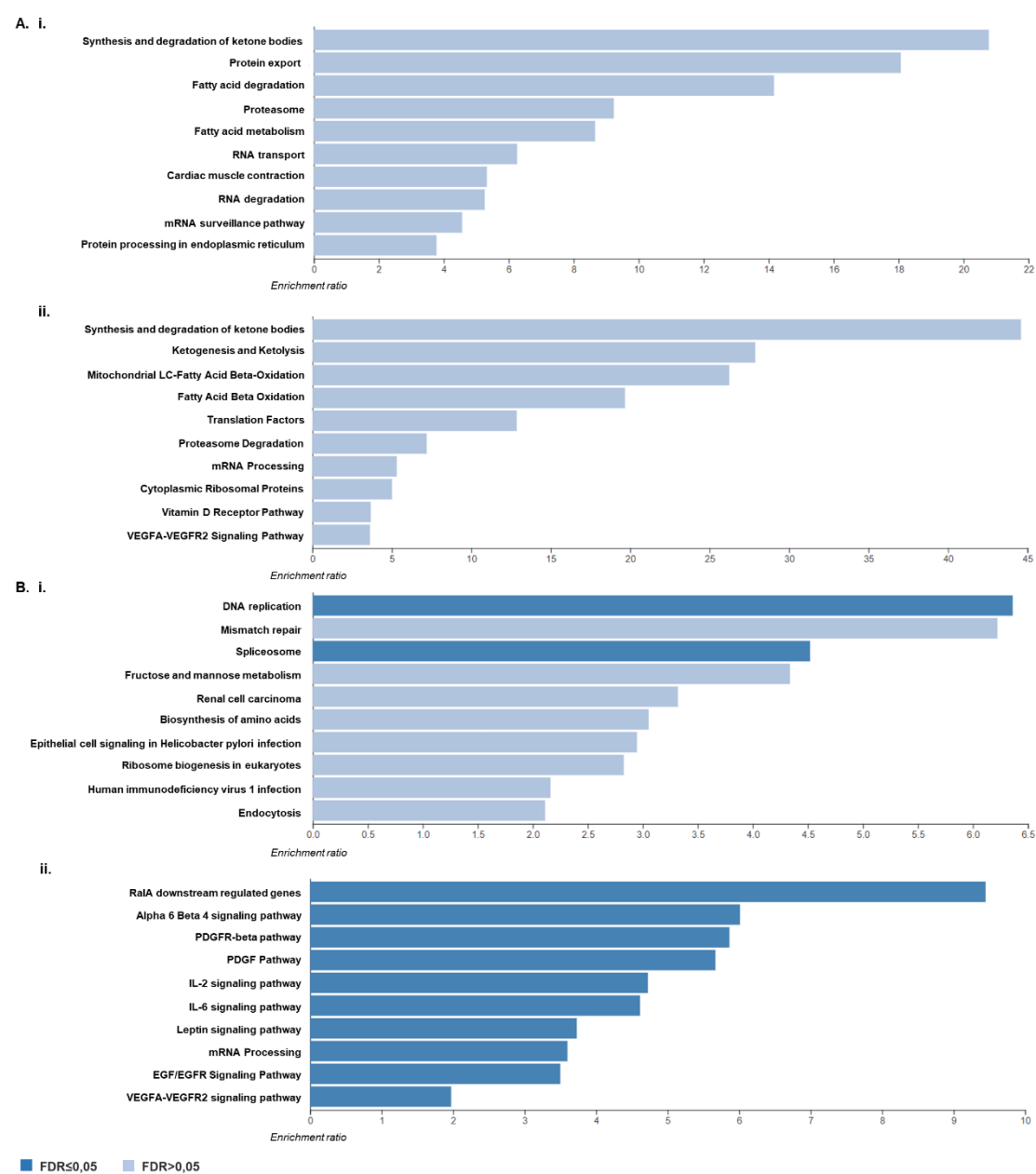


Figura 74. Vías de señalización desreguladas entre las EVs liberadas por las líneas celulares CAL33 y CAL33-R. A. Vías de señalización asociadas a las proteínas detectadas únicamente en las EVs procedentes de la línea celular CAL33. B. Vías de señalización asociadas a las proteínas detectadas únicamente en las EVs procedentes de la línea celular CAL33-R. Se representan las 10 vías de señalización con una mayor asociación empleando las bases de datos i. KEGG y ii. Wikipathway.

En ambos análisis se identificaron vías de señalización relacionadas con el procesamiento y transporte del RNA, con la síntesis, traducción, degradación y transporte de proteínas y con el metabolismo de ácidos grasos. Además, las proteínas detectadas exclusivamente en las EVs de la línea celular CAL33-R se asocian con la replicación y reparación del DNA y con vías de señalización con fuerte implicación en cáncer como la de EGF/EGFR y la de VEGFA/VEGFR2.

CAPÍTULO V. Análisis de la respuesta de las líneas celulares resistentes a taxanos a otras terapias.

En primer lugar, se analizó la respuesta a los otros fármacos que forman parte del régimen TPF, el 5-FU y el cisplatino, así como a la radiación, ya que se administra frecuentemente tras esta quimioterapia de inducción con el objetivo de identificar alteraciones en la respuesta a tratamientos asociadas a la resistencia a taxanos. Posteriormente, se estudió el nivel de daño en el DNA de las líneas celulares parentales y resistentes y se analizaron los cambios de expresión en genes reparadores del DNA. Finalmente, se exploraron posibles alternativas terapéuticas para el CECC resistente a taxanos.

1. Estudio de la respuesta a 5-fluorouracilo

El estudio de la respuesta a 5-FU mediante un ensayo de viabilidad celular MTT mostró que las líneas celulares resistentes a taxanos mantenían la respuesta a este fármaco (**Figura 75**).

La línea celular CAL33-R presentó una tendencia a una menor sensibilidad al 5-FU que la línea celular parental, especialmente en dosis y tiempos de tratamiento puntuales. Por el contrario, las células 32816-R muestran una mayor sensibilidad a este agente quimioterapéutico que las células parentales 32816.

En cualquier caso, todas las líneas celulares empleadas muestran una respuesta al 5-FU dosis y tiempo dependiente, de modo que las líneas celulares resistentes a taxanos no presentan resistencia cruzada al 5-FU. Además, no se puede establecer una correlación entre la resistencia a taxanos y una alteración en la sensibilidad a 5-FU, ya que en cada uno de los pares de líneas celulares empleados se observaron tendencias contrarias.

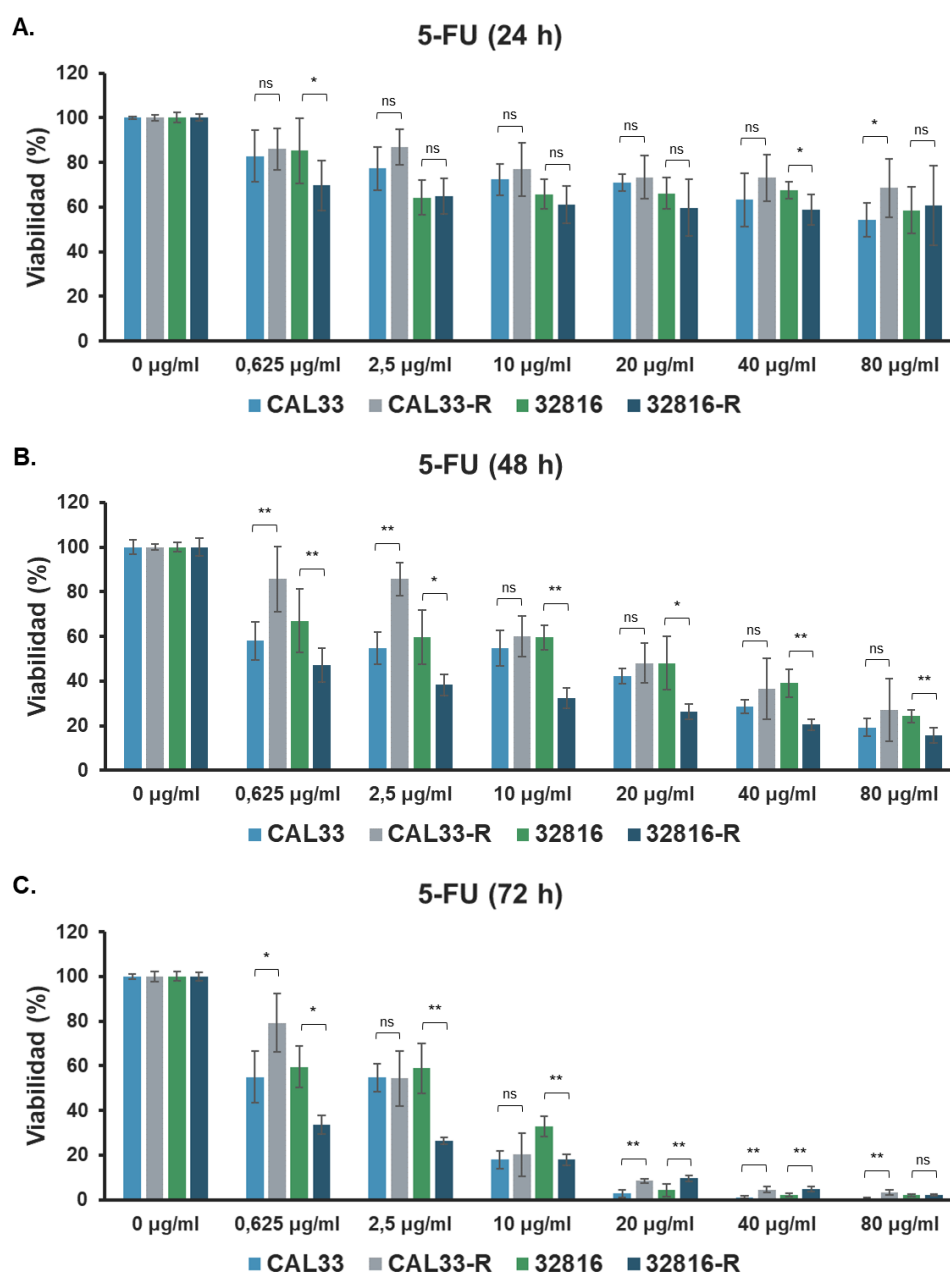


Figura 75. Respuesta a 5-FU determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos a distintos tiempos. A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó una normalización frente el control sin tratamiento de cada línea celular a cada tiempo. Se compararon los porcentajes de viabilidad a las distintas dosis y tiempo de cada una de las líneas celulares parentales con los de las respectivas líneas celulares resistentes a taxanos: CAL33 frente a CAL33-R y 32816 frente a 32816-R (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

2. Estudio de la respuesta a cisplatino

Se observó un incremento significativo de la sensibilidad a cisplatino en las líneas celulares resistentes a taxanos, especialmente pronunciado en la línea celular 32816-R

(Figura 76). La respuesta a cisplatino fue, en todos los casos, dosis y tiempo dependiente.

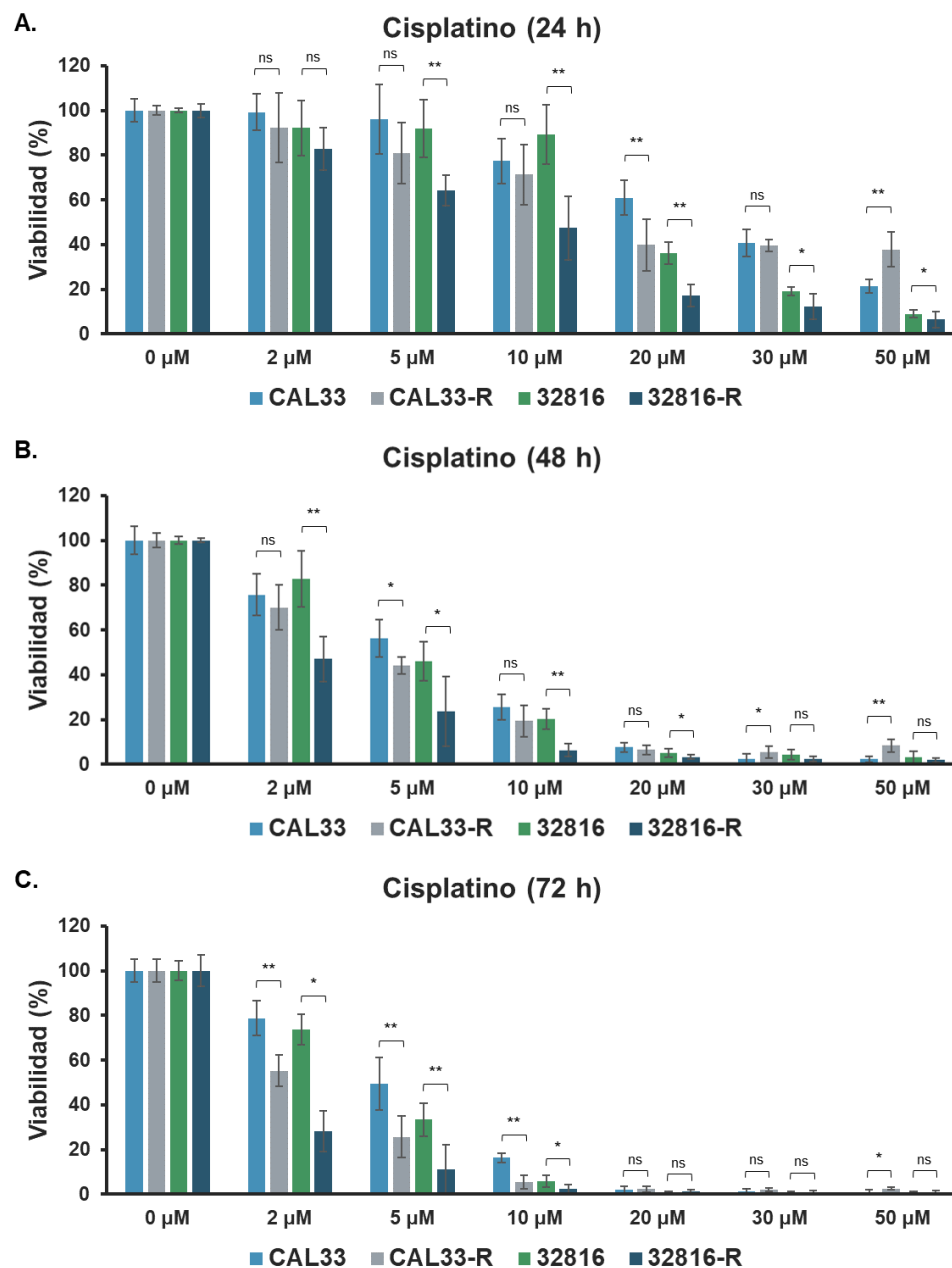


Figura 76. Respuesta a cisplatino determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos a distintos tiempos. A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó una normalización frente el control sin tratamiento de cada línea celular a cada tiempo. Se compararon los porcentajes de viabilidad a las distintas dosis y tiempo de cada una de las líneas celulares parentales con los de las respectivas líneas celulares resistentes a taxanos: CAL33 frente a CAL33-R y 32816 frente a 32816-R (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

3. Estudio de la respuesta a radiación

Las líneas celulares resistentes también mostraron un incremento significativo en la sensibilidad a la radiación con respecto a las líneas celulares parentales a las tres dosis empleadas, 5 Gy, 7,5 Gy y 10 Gy (**Figura 77**).

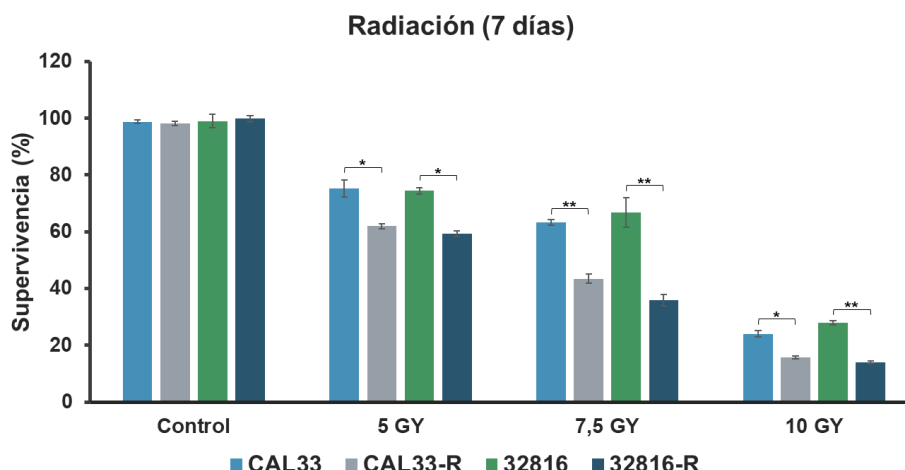


Figura 77. Respuesta a radiación determinada mediante ensayo de apoptosis por citometría de flujo de las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó una normalización frente el control sin irradiar de cada línea celular. Se compararon los porcentajes de supervivencia a las distintas dosis de cada una de las líneas celulares parentales con los de las respectivas líneas celulares resistentes a taxanos: CAL33 frente a CAL33-R y 32816 frente a 32816-R (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).

4. Análisis del daño en el DNA

Teniendo en cuenta las diferencias en la sensibilidad a agentes que dañan el DNA observadas entre las líneas celulares de CECC parentales y resistentes a taxanos se decidió analizar el nivel de daño en el DNA en las células mediante un ensayo COMET (**Figura 78**). Se observó un mayor nivel de daño basal en las líneas celulares resistentes a taxanos. Asimismo, también se identificó un mayor incremento en el nivel de daño tras el tratamiento con cisplatino (agente inductor de daño en el DNA) en las líneas celulares resistentes a taxanos. De hecho, tras el tratamiento con la dosis más baja empleada en cada caso, coincidente con la IC50 de la línea celular resistente a taxanos a 24 horas, las células parentales no presentan un incremento de daño respecto al control, mientras que las células resistentes a taxanos sí lo hacen. En todos los casos, la línea celular 32816-R presentó un mayor nivel de daño que las otras líneas celulares. De este modo, la resistencia a taxanos se asocia a un incremento del daño en el DNA en estos modelos celulares.

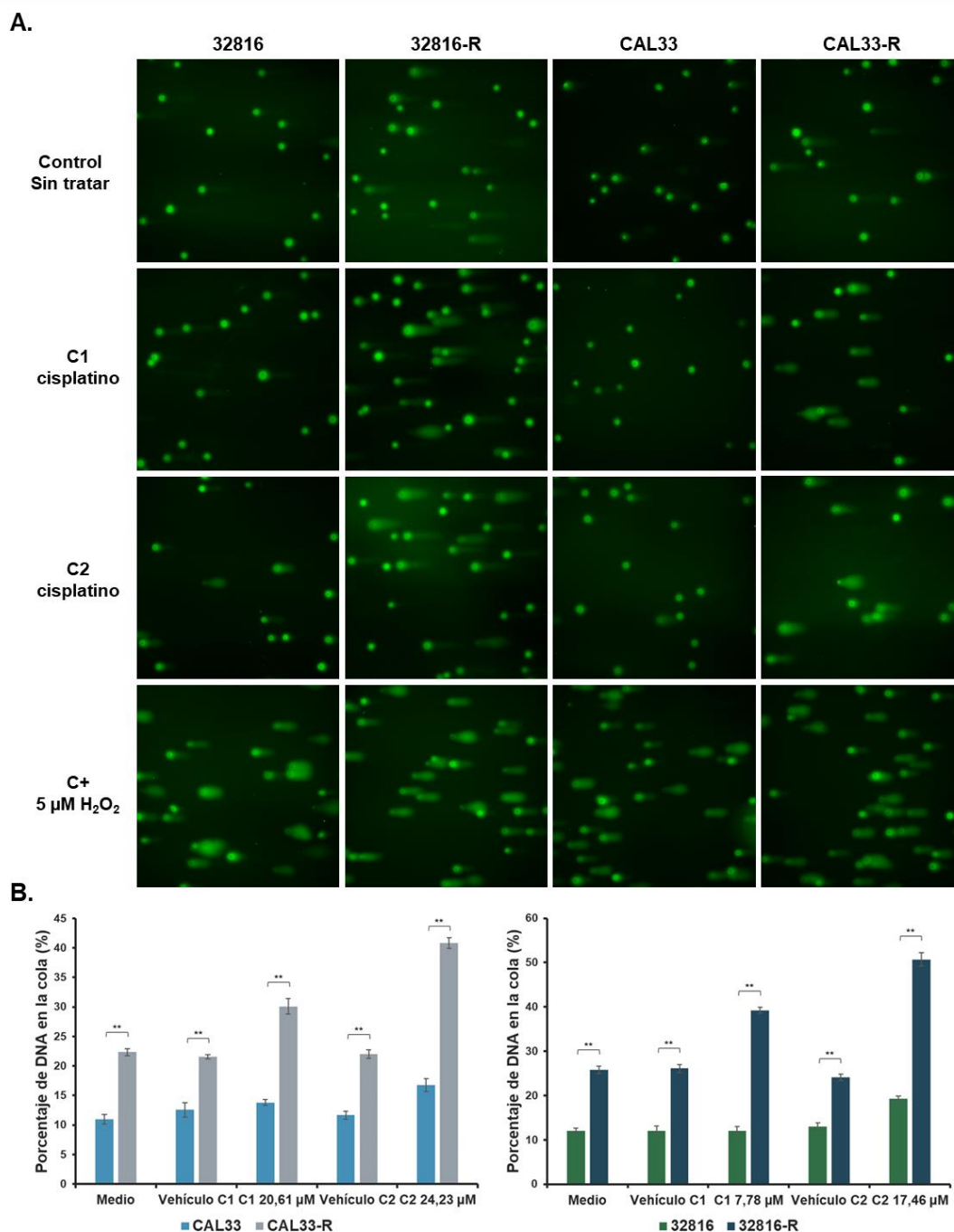


Figura 78. Nivel de daño en el DNA basal y tras el tratamiento con cisplatino en las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos determinado mediante el ensayo COMET. A. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. C1=7,78 μM y C2=17,46 μM para las líneas celulares 32816 y 32816-R; C1=20,61 μM y C2=24,23 μM para las líneas celulares CAL33 y CAL33-R. C1 se corresponde con la IC50 de cisplatino para la línea celular resistente a taxanos y C2 se corresponde con la IC50 de cisplatino para la línea celular parental a 24 horas. **B.** Cuantificación del nivel de daño en el DNA mediante el porcentaje de DNA en la cola. Se analizaron como mínimo 200 cometas por condición y experimento. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas (**: p-valor < 0,01).

5. Análisis de los cambios de expresión de genes asociados a la reparación del DNA

Considerando tanto la respuesta diferencial de las líneas celulares resistentes a taxanos a los agentes inductores de daño en el DNA como la presencia de un mayor nivel de daño en estas líneas celulares, se decidió estudiar la expresión de genes reparadores del DNA en las líneas celulares 32816 y 32816-R partiendo de los resultados obtenidos mediante *microarrays* de expresión analizando el conjunto de genes incluidos en el término GO “DNA repair” (GO:0006281). Se identificaron 88 genes desregulados de manera significativa en la línea celular 32816-R, considerando $p < 0,05$ y $FC > 2$ o $FC < -2$. En la **Tabla 33** se muestran los 25 genes involucrados en reparación del DNA con la expresión diferencial con mayor significación estadística.

Tabla 33. Genes diferencialmente expresados entre las líneas celulares 32816 y 32816-R implicados en la reparación del DNA. En verde se muestran los genes sobreexpresados en la línea celular 32816 RXT y el rojo los infraexpresados. Los genes se encuentran ordenados en función del tipo de alteración en la línea celular 32816-R (sobreexpresión o infraexpresión) y de mayor a menor significación estadística.

Gen	Cromosoma	p-valor	Intensidad de fluorescencia 32816 (log2)	Intensidad de fluorescencia 32816-R (log2)
KMT5C	19	9,04E-06	6,38	8,20
KIF22	16	1,06E-05	11,61	13,32
RECQL4	8	1,25E-05	6,00	7,49
MCRS1	12	1,82E-05	9,69	11,31
POLH	6	1,97E-05	8,66	9,98
RAD23A	19	3,12E-05	12,96	14,17
POLR2I	19	3,51E-05	8,08	9,63
UBE2A	X	3,93E-05	12,09	13,44
HMCES	3	4,14E-05	10,81	12,21
PARP10	8	4,84E-05	6,40	7,71
XRCC2	7	4,06E-06	11,22	7,87
UBE2V2	8	8,92E-06	12,34	10,56
UBR5	8	9,36E-06	9,86	8,29
CETN2	X	1,36E-05	12,39	10,78
PAXIP1	7	1,38E-05	11,56	9,80
FBXW7	4	1,85E-05	8,58	6,84
NABP1	2	3,48E-05	11,36	8,99
TRRAP	7	4,32E-05	7,78	6,36
POGZ	1	4,37E-05	4,88	3,52
SMG1	16	5,13E-05	14,30	12,76
NBN	8	5,31E-05	9,78	8,30
CDK7	5	5,55E-05	11,82	10,26
SMG1	16	6,11E-05	13,09	11,03
XRCC5	2	7,36E-05	7,26	5,20
UBE2W	8	8,15E-05	11,41	9,00

De este modo, se observaron alteraciones en la expresión en genes que participan en distintas vías de reparación del DNA, como la reparación por escisión de nucleótidos (*CETN2*) y la reparación de roturas de doble cadena mediante recombinación homóloga (*XRCC2*, *NBN*) y no homóloga (*XRCC5*). La realización de un análisis de enriquecimiento funcional con los 88 genes confirmó la alteración de diversas vías de reparación del DNA. Además, este análisis mostró alteraciones en otros procesos como el metabolismo de los ácidos nucleicos o la replicación del DNA (**Figura 79**).

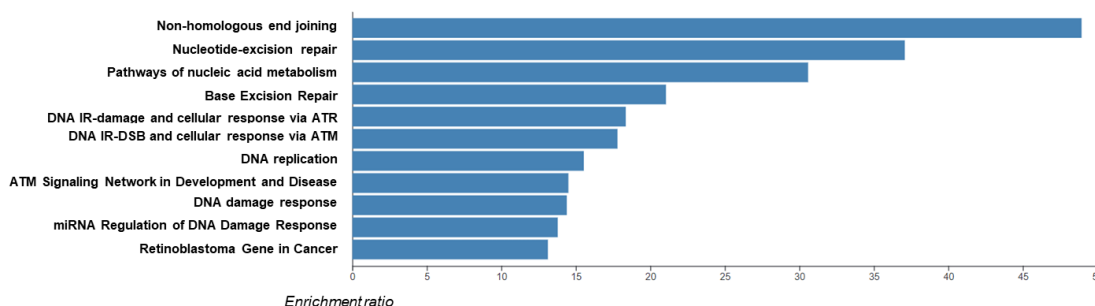


Figura 79. Vías de señalización en las que participan los genes asociados con reparación de daño en el DNA que presentan una expresión diferencial en la línea celular 32816-R. Se empleó la herramienta WebGestalt con el método ORA y la base de datos Wikipathway. Se muestran las vías de señalización con cambios de expresión estadísticamente significativos ($FDR < 0,05$).

6. Estudio de la respuesta a olaparib

Dada la alteración en la expresión de genes reparadores del DNA observada en la línea celular 32816-R, la presencia de más daño en el DNA en las dos líneas celulares resistentes a taxanos y la mayor sensibilidad de estas células a agentes que dañan el DNA, se decidió analizar la respuesta de las distintas líneas celulares a un agente inhibidor de la reparación del DNA, el olaparib (**Figura 80**).

Todas las líneas celulares mostraron una respuesta dosis y tiempo dependiente. Las líneas celulares de CECC resistentes a taxanos también mostraron una mayor sensibilidad a olaparib, siendo esta más notoria en la línea celular 32816-R.

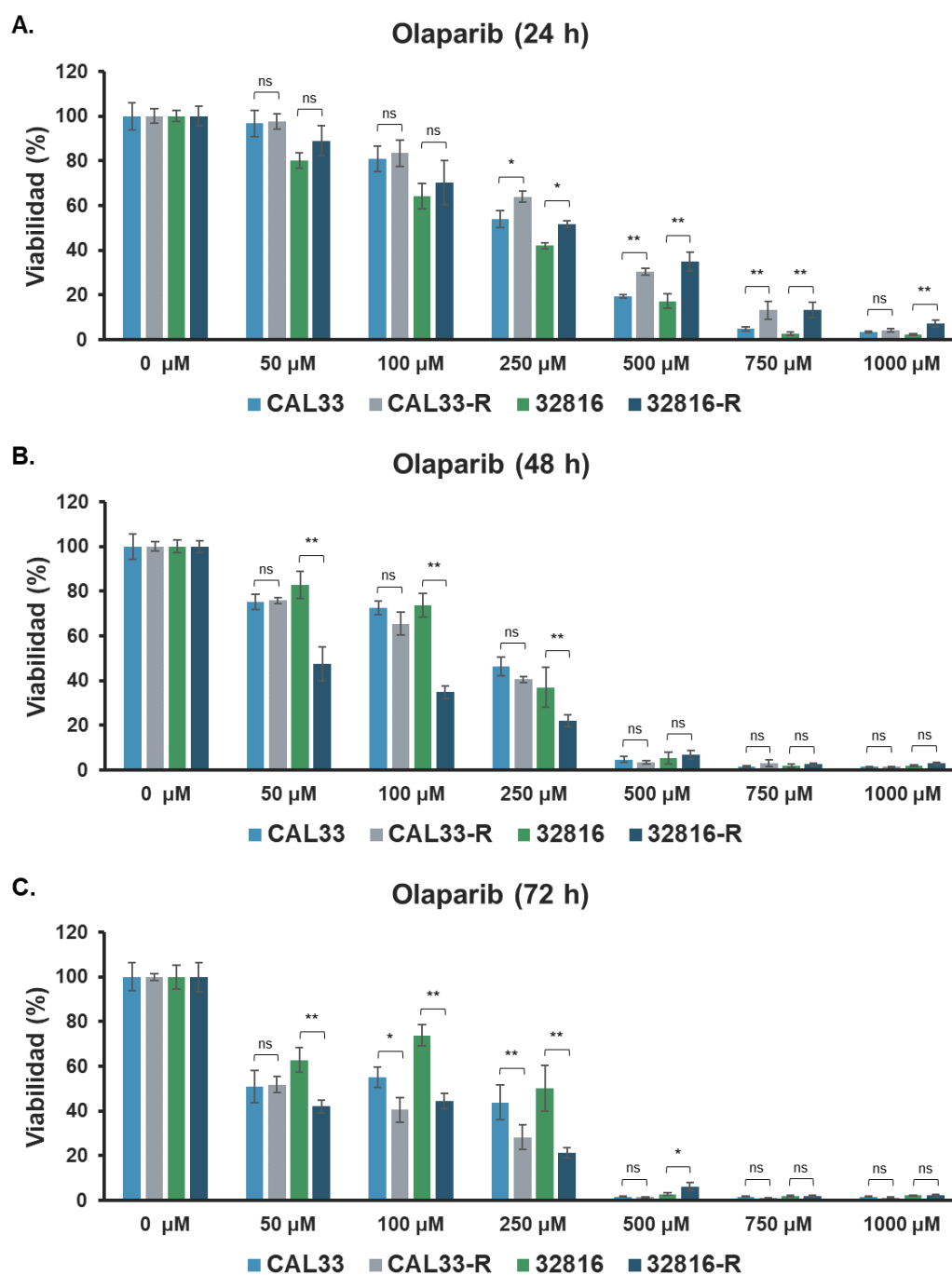


Figura 80. Respuesta a olaparib determinada mediante ensayo de viabilidad celular MTT de las líneas celulares parentales y resistentes a taxanos a distintos tiempos. A. 24 h; B. 48 h; C. 72 h. Se representa el valor promedio y la desviación estándar de tres réplicas biológicas. Se realizó una normalización frente el control sin tratamiento de cada línea celular a cada tiempo. Se compararon los porcentajes de viabilidad a las distintas dosis y tiempo de cada una de las líneas celulares parentales con los de las respectivas líneas celulares resistentes a taxanos: CAL33 frente a CAL33-R y 32816 frente a 32816-R (*: p-valor < 0,05; **: p-valor < 0,01; ns: no significativo).



DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

El carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) agrupa tumores heterogéneos con un origen común en el epitelio escamoso del tracto aerodigestivo superior. Esta entidad constituye el séptimo cáncer más común globalmente y presenta aproximadamente un 50% de mortalidad. La mayor parte de los casos se diagnostican en estadios localmente avanzados y los principales tratamientos cuando los tumores son irresecables se basan en la combinación de distintos regímenes de quimioterapia con radioterapia¹.

Una de las opciones terapéuticas que ofrece buenos resultados es el régimen TPF, tratamiento basado en la combinación de docetaxel, cisplatino y 5-FU, seguido de radioterapia. Sin embargo, existen subgrupos de pacientes que presentan fallo terapéutico temprano y mal pronóstico, en muchos casos porque el tumor presenta o adquiere resistencia al tratamiento. Dado que actualmente no existen biomarcadores que permitan identificar estos tumores, se tratan de manera homogénea tumores con diferentes grados de sensibilidad a fármacos, siendo necesario caracterizar los mecanismos que modifican la respuesta al tratamiento para optimizar la estrategia terapéutica y ofrecer una medicina de precisión^{130,131,139}. En este trabajo hemos analizado la resistencia a taxanos en muestras tumorales y modelos celulares de CECC.

1. Inducción de resistencia a taxanos en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello

Hemos establecido dos líneas celulares resistentes a paclitaxel y docetaxel, 32816-R y CAL33-R, a partir de dos líneas celulares, derivadas de un carcinoma orofaríngeo 32816 (VPH+) y de un carcinoma de lengua CAL33 (VPH-), incrementando progresivamente la dosis del fármaco paclitaxel. Estos dos fármacos son los inhibidores de microtúbulos más empleados en la práctica clínica y ejercen su acción mediante la estabilización de microtúbulos, aunque se han identificado ciertas diferencias entre ellos. Otros grupos han descrito la existencia de resistencia cruzada a estos dos fármacos en distintos tipos de tumores, como el cáncer de próstata o el cáncer gástrico^{146,269–271}. También se han descrito mecanismos moleculares comunes implicados en la resistencia a estos dos fármacos en CECC¹³⁰. Nuestros resultados confirman estas observaciones de otros grupos.

En el caso de la línea celular 32860, derivada de un carcinoma de laringe VPH-, aunque presentó una mayor sensibilidad basal al paclitaxel en relación con las otras dos líneas celulares incluidas en el estudio, no fue posible generar resistencia mediante el incremento progresivo de dosis; es más, al completar este proceso aumentó su sensibilidad al fármaco.

Con el objeto de analizar los cambios genéticos asociados al proceso de generación de resistencia al paclitaxel, se analizaron los cambios en el cariotipo en las tres líneas celulares (32860, 32816 y CAL-33). Nuestros resultados muestran cambios en el cariotipo de las células resistentes a paclitaxel (32816-R y CAL-33-R) en relación con las líneas celulares parentales (32816 y CAL-33), lo que sugiere que la exposición reiterada a este fármaco podría inducir cambios cromosómicos. Dado que los microtúbulos desempeñan un papel central en la segregación cromosómica durante la mitosis, el tratamiento con paclitaxel, al inhibir la polimerización de los mismos, podría afectar a este proceso y explicar la aparición de cambios citogenéticos²⁷². No obstante, no podemos descartar que los cambios en el cariotipo sean el resultado de la selección de clones resistentes a paclitaxel ya existentes en las líneas celulares parentales.

En el caso de la línea celular CAL33-R se observó un enriquecimiento del cariotipo tetraploide. Se ha descrito previamente que la tetraploidía genera inestabilidad cromosómica y se asocia con fallo terapéutico²⁷³. Por otra parte, la línea celular 32816-R presentó cambios, como la ganancia de los cromosomas 1 y 14, que podrían estar implicados en la resistencia a paclitaxel, si bien no existen estudios al respecto. Las ganancias o amplificaciones en 1q son cambios estructurales frecuentes en mieloma múltiple, cáncer de mama y cáncer de endometrio²⁷⁴⁻²⁷⁷. Se ha descrito la sobreexpresión de genes localizados en esta región relacionados con proliferación, como *PIP5K1A*, *MAPBPIP*, *RAB25A*, *PCTK3*, *RAB4* y *MPZL1*; regulación transcripcional y remodelación de la cromatina, como *USF1*, *JARID1B*, *TBX19* y *CROC4* y metabolismo celular, como *CA14* y *ALDH9A1*. *RAB25A* pertenece a la familia de oncogenes RAS y también ha sido asociado con la supervivencia y la migración celular²⁷⁵. Por otra parte, un estudio en el que se establece una línea celular de cáncer de ovario a partir de una muestra tumoral, asocia las amplificaciones en el brazo cromosómico 1q con una mayor resistencia a algunos fármacos, aunque el paclitaxel no está entre ellos²⁷⁸. Las ganancias en el cromosoma 14 no son muy frecuentes en cáncer, si bien han sido descritas en el tumor carcinoide ileal²⁷⁹; de hecho, la alteración más frecuente en este cromosoma es la pérdida de material genético que ha sido descrita, entre otros, en el carcinoma nasofaríngeo²⁸⁰.

La línea celular 32860, que no adquirió resistencia tras el tratamiento con dosis progresivamente mayores de paclitaxel, presentó un aumento de células poliploides y de células con endorreduplicación (replicación del DNA nuclear no asociada a división celular). Se ha descrito que el daño de los microtúbulos puede inducir endomitosis por pérdida de eficiencia de los puntos de control del ciclo celular, lo que condicionaría la respuesta a agentes quimioterápicos y podría dar lugar a el aumento de sensibilidad a fármacos inhibidores de microtúbulos^{273,281}. Por otra parte, la aneuploidía se asocia con un incremento de la resistencia a fármacos²⁸². Sin embargo, en este caso, no ha sido suficiente para adquirir resistencia a paclitaxel.

Debido al comportamiento diferencial de las líneas celulares 32816 y 32860, se compararon las alteraciones genéticas y moleculares de cada una de ellas. Ambas líneas celulares presentaron alteraciones citogenéticas comunes frecuentes en CECC, como ganancias en 3q, 7p, 8q, 9q y 20q y pérdidas en 3p y 18q²⁸³. Además, en ambos casos se identificó la presencia de un isocromosoma 8 (un cromosoma anormal en el que uno de los brazos cromosómicos se duplica de forma especular y el otro se pierde)^{284,285}. Las aberraciones estructurales en este cromosoma son frecuentes en CECC y afectan principalmente a la región centromérica, dando lugar a la formación de isocromosoma con ganancias en 8q. En la región 8q24.21 se encuentra el oncogén *MYC*, implicado en la progresión del ciclo celular, la apoptosis y la transformación celular²⁷⁴. Las pérdidas en 3p, encontradas en las dos líneas celulares, se han descrito como un evento temprano en el proceso carcinogénico del CECC.

Los primeros estudios moleculares en CECC identificaron pérdidas frecuentes de material genético en las regiones 3p14.2, 3p21.3 y 3p25. Posteriormente, la secuenciación de nueva generación permitió identificar pérdidas de mayor tamaño en este brazo cromosómico. La correlación entre la pérdida de 3p en CECC y el pronóstico clínico se ha descrito en diversas cohortes de pacientes. Las deleciones en las regiones 3p12.1 y 3p14.2, observadas en las dos líneas celulares, se han asociado con estadios tumorales tempranos, mientras que las pérdidas que afectan a la región terminal se han identificado principalmente con estadios avanzados y se han asociado con características clínico-patológicas adversas, una mayor agresividad del tumor y un peor pronóstico^{112,113,286}. La pérdida de la región distal 3p21.1-3p26.3 se encontró sólo en la línea celular 32860. Si bien las pérdidas en 3p son frecuentes en CECC VPH+ y VPH-, las pérdidas del extremo terminal se detectan principalmente en tumores VPH-¹¹³, lo cual es coherente con que solo hayamos detectado esta anomalía de la región terminal del brazo 3p en la línea celular 32860. Por otra parte, las pérdidas en 11q se han

asociado principalmente con CECC VPH⁺²⁸⁷ y nosotros la hemos encontrado sólo en la línea celular 32816.

El estudio de aCGH se completó con un análisis del perfil transcriptómico mediante *microarrays* de expresión. El análisis del transcriptoma centrado en la región 3p26.3-3p21.1 permitió identificar 22 genes infraexpresados en la línea celular 32860 en relación con la línea 32816. Aunque entre los genes ubicados en esta región se encuentran los genes supresores tumorales *ROBO1*, *FHIT* y *VHL*¹¹²; ninguno de ellos se encontró infraexpresado en la línea celular 32860. El análisis de enriquecimiento funcional realizado con los genes infraexpresados reveló su asociación con el proceso de autofagia, proceso que interviene en la degradación de proteínas y orgánulos para el mantenimiento de la homeostasis metabólica de las células²¹⁴. Entre los 22 genes infraexpresados se encontraba *ATG7*, localizado en la región 3p25.3. La alteración diferencial de este gen en la línea celular 32860 se confirmó al demostrar, por *western blot*, la falta de expresión de la proteína. Hasta el momento, solo se ha descrito la pérdida de *ATG7* en una línea celular de cáncer de pulmón y se ha asociado con la inactivación de la autofagia²⁸⁸.

ATG7 desempeña un papel esencial para la iniciación del proceso canónico de autofagia, proceso que presenta un papel dual en cáncer dependiendo del tipo tumoral, el estadio y el contexto genético²¹⁴. En términos generales, se ha descrito que la autofagia desempeña un papel supresor en la iniciación tumoral, pero favorece la progresión y supervivencia de los tumores ya establecidos. *ATG7* es un gen cuya pérdida heterocigota afecta a las características tumorales y la respuesta al tratamiento en modelos de adenocarcinoma ductal de páncreas, sugiriendo que la haploinsuficiencia (pérdida de expresión de un alelo) de este gen podría ser patogénica²⁸⁹. Además, se ha asociado la pérdida de *ATG7* con una reducción de la sensibilidad a los taxanos en líneas celulares de cáncer de pulmón²⁹⁰.

A la vista de este resultado, se estudió, mediante *western blot*, la vía de señalización de la autofagia en las líneas celulares 32860 (con pérdida de *ATG7*) y 32816 (sin alteración en *ATG7*), observando en la línea celular 32860 un aumento significativo de la expresión de p62 y una disminución de la activación de LC3B, lo que sugiere un bloqueo de la autofagia, consistente con el papel esencial de *ATG7* en este proceso²¹⁴. Tanto los niveles de expresión de p62 como la conversión de LC3B-I en su isoforma activa LC3B-II son marcadores establecidos de autofagia activa²⁹¹.

Con el objetivo de determinar si la incapacidad de generar resistencia a paclitaxel en la línea celular 32860 se debía a la pérdida de *ATG7* y la consecuente inhibición de

la autofagia canónica, se decidió deletar este gen y estudiar los efectos de dicha pérdida en línea celular 32816. Para ello, se caracterizaron clones *knockout* para *ATG7* generados mediante la tecnología CRISPR/Cas9.

2. El papel de la pérdida *ATG7* en la línea celular 32816

El sistema CRISPR/Cas9 había demostrado previamente su eficiencia y utilidad en el estudio de la autofagia, ya que permite una inhibición completa y específica de esta vía de señalización mediante la inactivación de genes clave para este proceso, como *ATG5* y *ATG7*²⁹². Por este motivo, se diseñó un sistema para establecer clones *knockout* de *ATG7* en la línea celular 32816 (32816-*ATG7*-KO).

El análisis del estado de la autofagia en los tres clones 32816-*ATG7*-KO puso de manifiesto la acumulación de p62 y la falta de activación de LC3B en estas células, observada también en la línea celular 32860 y asociada con un bloqueo de la autofagia²⁹¹. La proteína *ATG7* media la conversión de LC3B-I a su isoforma activada LC3B-II a través de su participación del sistema *ATG8*²¹², por lo que la inactivación de *ATG7* disminuye la expresión de LC3B-II al no producirse la transformación de LC3B-I.

ATG7 participa también en el ensamblaje del complejo formado por *ATG5*, *ATG12* y *ATG16L1*²¹², por lo que la inactivación de *ATG7* causa una disminución pronunciada en los niveles de expresión del complejo *ATG5*-*ATG12* y de la proteína asociada *ATG16L1*. El estudio, mediante *western blot*, de la expresión de estas proteínas en los clones 32816-*ATG7*-KO confirmó que la pérdida de expresión de *ATG7* altera la formación de este complejo.

La realización de estudios de inmunofluorescencia confirmó la acumulación de p62 y mostró una ligera disminución de la expresión de LC3B en los clones 32816-*ATG7*-KO, aunque se debe tener en consideración que esta técnica no permite distinguir las dos isoformas de esta proteína. También se analizó la localización de la proteína LAMP-1, que está presente en la membrana lisosomal y colocaliza con p62 en los autofagolisosomas. En los clones 32816-*ATG7*-KO se observó un incremento de expresión de LAMP-1 indicativo de un mayor número de lisosomas, con escasa colocalización con p62, lo que indica que en la pérdida de expresión de *ATG7* impide la fusión de los autofagosomas con los lisosomas^{212,291,293}. Todo esto, en su conjunto, apoya el papel esencial de *ATG7* en la autofagia canónica descrito en otros tipos de cáncer hasta el momento²¹⁴.

El análisis de la respuesta a paclitaxel en los clones 32816-ATG7-KO mostró una reducción de la sensibilidad a este fármaco. Aunque el efecto principal del paclitaxel consiste en la estabilización de la polimerización de los microtúbulos, este fármaco también afecta a la apoptosis y a la autofagia, incrementando la expresión de LC3B-II, ATG5, PI3K de clase III y BECLIN1 y disminuyendo los niveles de p62. Esta inducción de la autofagia mediada por paclitaxel contribuye al efecto citotóxico de este fármaco^{143,144}. La imposibilidad de inducir la autofagia en las células carentes de ATG7 podría ser la responsable de la reducción del efecto del paclitaxel en los clones 32816-ATG7-KO. Además, ATG7 tiene otras funciones independientes de la autofagia, como la regulación del ciclo celular, que también podrían condicionar la respuesta a paclitaxel. La pérdida de este gen se ha asociado previamente a una reducción de la sensibilidad a algunos fármacos, incluidos los taxanos, en otros tipos de cáncer²⁹⁰.

La inducción de resistencia a paclitaxel mediante el incremento progresivo de dosis en los clones 32816-ATG7-KO y 32816-PX (transfectados con un plásmido vacío a modo de control) mostró que los clones 32816-ATG7-KO adquieren una mayor tolerancia al paclitaxel tras un menor número de ciclos de tratamiento. Una posible explicación a este efecto podría ser que estos clones ya presentaban una menor sensibilidad de manera basal. La mayor facilidad de los clones 32816-ATG7-KO para adquirir resistencia a paclitaxel podría explicar la asociación entre la pérdida de la región genómica en 3p, donde se localiza ATG7, con el fallo terapéutico y mal pronóstico de estos casos^{112,113}.

Estos resultados descartan que la dificultad para adquirir resistencia a paclitaxel observada en la línea celular 32860 sea consecuencia de la pérdida de ATG7 asociada a la deleción de la región 3p, por lo que podrían ser otros genes localizados en esta región o en otras zonas del genoma, los responsables de dicha observación. Además, es preciso tener en consideración el papel dual de la autofagia en cáncer, que depende de muchos factores, como el origen tumoral o el resto de alteraciones genéticas del tumor²¹⁴, distintos entre las líneas celulares 32816 y 32860.

3. Alteraciones genómicas en muestras tumorales de CECC

En este trabajo se ha estudiado, mediante aCGH, DNA obtenido de tejido parafinado derivado de 177 CECC diagnosticados en estadios localmente avanzados, identificando las alteraciones genómicas más frecuentes. En la serie global, las pérdidas en 3p, 21p, 11q, 9p, 18q y 4p y las ganancias en 3q, 8q, 5p, 20p y 20q, alteraciones descritas previamente en CECC, fueron los cambios genómicos detectados con mayor

frecuencia^{114,283,284}. Muchos de estos cambios genómicos son coincidentes con los detectados en las líneas celulares 32816 y 32860, incluyendo las pérdidas en 3p y 18q y las ganancias en 3q, 8q, 20p y 20q. Se conoce que las alteraciones en el número de copias desempeñan un papel importante en la progresión del cáncer y que el perfil genómico puede tener implicaciones en la etiología, la evolución y el pronóstico del cáncer, ya que en muchos casos esto no depende de alteraciones de un solo gen sino de la combinación de varios cambios genómicos²⁹⁴. Hasta el momento, no se han realizado estudios de aCGH en series de pacientes con CECC de este tamaño con tumores diagnosticados en el mismo estadio y tratados de manera homogénea. Por este motivo, nuestros resultados pueden contribuir a definir mejor el perfil genómico de estos tumores y su asociación con la respuesta al tratamiento.

Posteriormente, se comparó la recurrencia de las alteraciones genéticas en función de los subgrupos de respuesta al régimen TPF: estabilización de la enfermedad, respuesta parcial o completa, y toxicidad al tratamiento. Las pérdidas en 4p mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los subgrupos, estando presentes en un 20,6% de los casos con estabilización de la enfermedad, un 44,3% de los casos con respuesta completa o parcial y un 66,7% del grupo con toxicidad. No se identificaron genes localizados en esta región cromosómica cuya delección o infraexpresión se asocie con la resistencia a fármacos²⁹⁵, por lo que resulta de interés profundizar en el estudio de esta región.

El análisis de los cambios focales reveló que las pérdidas en las regiones 4p15.31 y 4p15.32 son mucho más frecuentes en el grupo con toxicidad (76,19% y 90,48%, respectivamente) que en el de respuesta completa o parcial (59,84% y 59,02%) y en el de estabilización de la enfermedad (32,35% en ambos casos). Este resultado refuerza la hipótesis de que los genes localizados en 4p desempeñan un papel en la respuesta al tratamiento TPF. El análisis de enriquecimiento funcional realizado con los genes localizados en 4p identificó una asociación con las vías de señalización de Notch y Sonic-Hedgehog. El papel de estas vías de señalización en la respuesta terapéutica en CECC no está bien descrito, pero su alteración se ha asociado con quimiorresistencia en cáncer de mama, de ovario y de páncreas^{196,296–298}. Por otra parte, se ha descrito un papel dual de la señalización mediada por los receptores Notch en CECC¹⁰⁵. Sería interesante completar este estudio analizando el estado de los genes de esta región mediante otra técnica y caracterizando su alteración en CECC para confirmar su papel en la respuesta al tratamiento.

El número de alteraciones en el número de copias, medido a través del porcentaje del genoma afectado, ha demostrado ser un factor pronóstico en algunos tipos de cáncer, como el carcinoma renal de células claras, el cáncer de tiroides, de colon, de próstata, de endometrio y de mama^{299,300}. En nuestro trabajo, hemos observado un elevado porcentaje de tumores con alteraciones genómicas, detectadas por aCGH, en el grupo de pacientes con CECC que presentaron toxicidad al tratamiento con TPF, mientras que los casos con estabilización de la enfermedad presentaban menos cambios genómicos. Dado que el estudio se realizó en muestras obtenidas antes del inicio de la terapia TPF, estos datos sugieren que la determinación del número total de alteraciones detectadas por aCGH podría ser utilizado como biomarcador para predecir la toxicidad del tratamiento TPF en los pacientes con CECC.

El análisis de la región 3p25.3, donde se encuentra el gen *ATG7*, permitió identificar ganancias en esta región en un 4,82% de los casos y pérdidas, principalmente heterocigotas, en un 64,41%, de modo que la pérdida del gen *ATG7* es un evento frecuente en CECC. Se ha descrito que la haploinsuficiencia del gen *ATG7* desempeña un papel en la supresión de la progresión tumoral en el adenocarcinoma ductal de páncreas, por lo que la pérdida en heterocigosis de este gen también podría tener importancia en el desarrollo de CECC²⁸⁹. Al estudiar la pérdida de esta región cromosómica de acuerdo con los subgrupos de evolución clínica, no se encontraron diferencias significativas; si bien los casos con estabilización de la enfermedad presentaron un menor porcentaje de deleciones (50%). Finalmente, se analizó el estado de *ATG7* en 15 muestras de CECC, procedentes de otra serie de pacientes, mediante qPCR y únicamente se identificó un caso con deleción de este gen. Es preciso tener en cuenta que la serie de pacientes estudiada por qPCR tiene un tamaño muy reducido y, además, solo se estudió un exón, con lo cual, podría haber alteraciones en *ATG7* que no se estén teniendo en consideración. Por otra parte, al no pertenecer estos pacientes a la serie estudiada por aCGH, pueden presentar diferencias clínicas que expliquen la disparidad de este resultado.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es que solo se analizaron muestras obtenidas en el momento del diagnóstico, por lo que no se han podido tener en cuenta las alteraciones genéticas adquiridas por exposición al tratamiento, que podrían desempeñar un papel importante en la respuesta al tratamiento. Además, los datos de respuesta se determinaron tras el tratamiento a TPF, que incluye docetaxel, cisplatino y 5-FU, por lo que no es posible saber si la respuesta observada se debe al tratamiento conjunto o únicamente a alguno de los fármacos empleados.

4. Estudio molecular y fenotípico de la resistencia a taxanos

Con el objetivo de determinar los cambios genómicos inducidos por el tratamiento con dosis incrementadas de paclitaxel, llevamos a cabo un estudio de aCGH en las líneas celulares 32816 y 32816-R. En el análisis de los resultados destacaron las alteraciones observadas en 7q, pues, mientras que la línea celular 32816 no presentaba cambios en esta región, la línea celular 32816-R presentaba una delección de gran tamaño seguida de una ganancia de material genético, descrita previamente por otros grupos y asociada con mal pronóstico. En CECC, las pérdidas en 7q se consideran un evento tardío en la carcinogénesis³⁰¹. Además, en otros tipos de cáncer, especialmente en las neoplasias mieloides, la pérdida de heterocigosidad en 7q es muy frecuente, aunque su papel en el desarrollo tumoral no esté claro^{302,303}. En cáncer de mama esta alteración se ha asociado con mayor riesgo de metástasis y peor pronóstico³⁰⁴. Nuestro estudio sugiere que la pérdida de 7q también podría estar relacionada con la resistencia a los taxanos en CECC. Entre los genes localizados en 7q se encuentra *TRAPPC14*, que codifica una proteína implicada en la regulación de microtúbulos, aunque no se ha estudiado en cáncer hasta el momento³⁰⁵. La pérdida del gen *SUMF2*, también localizado en esta región, se ha relacionado con la adquisición de resistencia al bortezomib en casos de mieloma múltiple³⁰⁶.

El estudio del transcriptoma mediante *microarrays* de expresión reveló la alteración de vías de señalización en la línea celular 32816-R que participan en procesos clave en la respuesta terapéutica y el desarrollo tumoral, como el metabolismo celular, la respuesta al daño en el DNA, la regulación del ciclo celular o la transición epitelio-mesénquima. El gen con un mayor aumento de expresión en la línea celular 32816-R fue *ABCB1*, que codifica la proteína MDR1, una bomba de expulsión de fármacos dependiente de ATP asociada a resistencia a múltiples fármacos, incluyendo los taxanos, en distintos tipos de cáncer^{130,169,295}. El gen *ABCB1* se localiza en la región 7q21.12, que se encuentra en la región del brazo cromosómico 7q que está amplificada en la línea celular 32816-R. En algunos tipos de leucemia mieloide aguda se ha descrito una sobreexpresión transcripcional de *ABCB1* en aquellos casos que presentan monosomía parcial o total del cromosoma 7, aunque se desconoce el mecanismo subyacente³⁰⁷. Esto sugiere que las aberraciones estructurales en este cromosoma que implican pérdidas y ganancias de material genético pueden favorecer la ganancia a nivel focal de la región donde está *ABCB1* y su consecuente sobreexpresión, no solo en leucemias, sino también en tumores sólidos como el CECC.

Por otra parte, el gen con una disminución de la expresión más pronunciada en la línea celular 32816-R fue *DNAJC15*, que codifica la proteína MCJ, un regulador negativo del Complejo I de la cadena transportadora de electrones y, consecuentemente, de la producción de ATP mitocondrial²⁶⁸. La pérdida de expresión de este gen, habitualmente secundaria a metilación de la región promotora del mismo, conduce a un incremento de la producción de ATP, que podría ser empleado por bombas de expulsión de fármacos como MDR1. A pesar de los escasos estudios existentes sobre el papel de *DNAJC15* en cáncer, la disminución de su expresión ha sido asociada a un aumento de resistencia a múltiples fármacos en cáncer de mama y ovario, estando también presente en estos casos la sobreexpresión de *ABCB1*^{308,309}. Concretamente, se ha descrito que la sobreexpresión del gen *ETV7* causa la represión de *DNAJC15* dando lugar a la resistencia a doxorrubicina en cáncer de mama³⁰⁸ y, además, se ha sugerido que MCJ (*DNAJC15*) promueve la degradación de c-Jun para prevenir la expresión de *ABCB1*. De este modo, la disminución de la expresión de *DNAJC15* contribuiría a la sobreexpresión de *ABCB1* a través de c-Jun³⁰⁹.

También hemos estudiado otros genes, como *BIRC5*, *CYCS*, *NFKB1* y *TUBB3*, que presentaban expresión diferencial significativa en la línea celular 32816-R y cuya alteración se había asociado previamente a resistencia a taxanos en CECC¹³⁰. En cuanto al gen *CYCS*, que codifica el citocromo c, se ha descrito que su liberación de la mitocondria al citoplasma puede producir la activación de las caspasas y a la inducción de la apoptosis celular. Este mecanismo tiene una mayor importancia en la resistencia a cisplatino, pero también se ha asociado con la resistencia a paclitaxel. Además, el citocromo c participa en la cadena transportadora de electrones mitocondrial, contribuyendo a la producción de ATP y la disminución de su expresión se ha asociado a un incremento de resistencia a distintos fármacos, incluyendo los taxanos, en tumores con un metabolismo energético glicolítico^{130,310}. Por otro lado, se ha descrito que la activación de NF-κB media la expresión de la survivina (codificada por *BIRC5*), contribuyendo a la resistencia a taxanos. La survivina puede inhibir la caspasa-9, bloqueando la apoptosis. A pesar de que se identificó un aumento de expresión significativo en *NFKB1*, la diferencia de expresión en *BIRC5* entre 32816 y 32816-R presentó un FC<2 y no se identificaron cambios de expresión significativos en la caspasa-9^{130,181}. Además, dado que los taxanos interfieren en el ensamblaje de los microtúbulos, es coherente que las alteraciones que afecten a este proceso condicionen la sensibilidad a este tratamiento. Se ha descrito que un incremento en los niveles de tubulina-βIII (codificada por *TUBB3*) provoca un incremento de resistencia a paclitaxel. Sin embargo, en estudios basados en el análisis de biopsias de CECC no se encontró

una correlación significativa entre los niveles de expresión de *TUBB3* y la respuesta al tratamiento u otras implicaciones clínicas^{130,189,190}.

Tanto la sobreexpresión de *NFKB1* y *TUBB3* como la infraexpresión de *CYCS* en la línea celular 32816-R respecto a la línea celular parental 32816 se comprobó mediante RT-qPCR. Sin embargo, en la línea celular CAL33-R no se observaron estos cambios cuando se compararon los niveles de expresión de estos genes con los de la línea celular parental CAL33. De hecho, se observó un incremento en la expresión de *CYCS*, al contrario que en la línea celular 32816-R, que podría estar relacionado con un incremento del ATP mitocondrial. De este modo, estos cambios no fueron comunes en las dos líneas celulares resistentes a taxanos. Además, a pesar de que se ha descrito su papel en la resistencia, no se ha demostrado que sean mecanismos esenciales para el desarrollo de la misma. Por todo ello, se decidió centrar el estudio en las alteraciones identificadas en *ABCB1* y *DNAJC15*.

Tras confirmar las alteraciones de *ABCB1* y *DNAJC15* en las líneas celulares 32816-R y CAL33-R mediante *western blot*, se demostró que ambas alteraciones son esenciales en la resistencia a taxanos en las líneas celulares de CECC. Para probar la esencialidad de MDR1, se empleó el tratamiento con verapamilo, un inhibidor de los canales de calcio, que inhibe la función transportadora de esta bomba de eflujo³¹¹. Trabajos previos de otros grupos ya habían puesto de manifiesto la reversión de la resistencia a taxanos tras tratamiento con verapamilo, si bien se ha sugerido que esta alteración no es suficiente para generar la resistencia y que, por sí sola, no constituye un biomarcador de resistencia efectivo³¹²⁻³¹⁴. Nuestros resultados confirman la reversión de la resistencia con verapamilo. En nuestro estudio, la sobreexpresión de MDR se asocia con infraexpresión de *DNAJC15* en la línea celular 32816-R. La sobreexpresión de *DNAJC15* en la línea celular 32816-R tras su transfección con un vector retroviral permitió revertir la resistencia a paclitaxel, poniendo de manifiesto la relevancia de esta alteración y la existencia de un mecanismo conjunto en el que tanto *ABCB1* como *DNAJC15* desempeñan un papel necesario.

Los transportadores ABC necesitan cantidades importantes de ATP para transportar sustratos y, algunos de ellos, como *ABCB1*, son capaces de expulsar fármacos. De hecho, estudios bioquímicos han probado que se necesitan hasta dos moléculas de ATP para expulsar una molécula de sustrato³¹⁵. Por este motivo, las alteraciones metabólicas tienen un papel importante en la resistencia mediada por estos transportadores. A pesar de que la respiración mitocondrial es la principal vía de obtención de ATP en la mayoría de las células, se ha demostrado que las células tumorales emplean la glicólisis aerobia

en detrimento de la fosforilación oxidativa para generar lactato en lugar de ATP, de manera que adquiere una mayor relevancia la generación de ATP mitocondrial independiente de la glicólisis. Este fenómeno, denominado efecto Warburg, forma parte de los *hallmarks* del cáncer y se ha asociado con la quimiorresistencia, si bien los mecanismos subyacentes no han sido bien caracterizados^{316–318}.

Estudios recientes han demostrado que los transportadores ABC usan ATP mitocondrial como la principal fuente de ATP para la expulsión de fármacos en células tumorales quimiorresistentes³¹⁹. Además, se ha probado que el incremento de la producción de ATP mitocondrial puede estar mediado por la pérdida de expresión de *DNAJC15*^{202,268,319}. Nuestros resultados sugieren que el estudio conjunto de *DNAJC15* y *ABCB1* podría utilizarse como biomarcador de respuesta a taxanos.

La ausencia de cambios de expresión en los genes *DNAJC15* y *ABCB1* en la línea celular parental 32860 obtenida tras la exposición a dosis crecientes de paclitaxel podría explicar que esta línea celular no adquiera resistencia estable a taxanos. El aumento de expresión de *ABCB1* y la disminución de la expresión de *DNAJC15* en los clones 32816-ATG7-KO-R podría neutralizar el efecto de la pérdida de *ATG7* y explicar la aparición de resistencia en esta línea celular.

Teniendo en cuenta todo esto, es preciso considerar MDR1 y MCJ (*DNAJC15*) como posibles dianas terapéuticas para revertir la resistencia a taxanos. El verapamilo bloquea los canales de calcio y la actividad transportadora de MDR1. Por este motivo, su administración en combinación con los taxanos en CECC resistente parece una alternativa terapéutica interesante para resensibilizar el tumor. Esta estrategia terapéutica se comenzó a estudiar hace más de 30 años y existen muchos artículos publicados que valoran el potencial del verapamilo en la reversión de la resistencia, llegando a conclusiones contradictorias. Los ensayos clínicos que se han realizado demuestran que el uso de verapamilo en tumores resistentes a taxanos no mejora la respuesta obtenida con otras líneas de tratamiento^{311,320–326}. Sería interesante explorar otras opciones terapéuticas dirigidas a inhibir la sobreexpresión de MDR1. Por otro lado, se ha descrito que la combinación de miméticos de MCJ (*DNAJC15*) con los taxanos puede revertir la resistencia mediada por MDR1, mediante ensayos preclínicos *in vitro* e *in vivo*³¹⁹. Se trata de un estudio preliminar, pero que abre una puerta al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para hacer frente a la problemática de la resistencia a taxanos.

La caracterización fenotípica de las líneas celulares resistentes a taxanos mostró un aumento de la capacidad migratoria en las células 32816-R y CAL33-R con respecto a

las líneas celulares parentales. En nuestro conocimiento, no se han establecido y caracterizado líneas celulares de CECC resistentes a taxanos hasta el momento, pero sí se han realizado estudios en otros tipos de cáncer que demuestran que las líneas celulares resistentes a taxanos presentan un fenotipo asociado a la transición epitelio-mesénquima³²⁷. Algunos de los genes que se han visto implicados en este fenotipo en otros tipos de cáncer son *ST3GAL1*, *TGFB1*, *VIM*, *CDH1*, *CDH2*, *NEAT1* y *KRT17*³²⁸⁻³³¹, que no hemos encontrado alterados significativamente en la línea celular 32816-R. Sin embargo, hemos identificado cambios de expresión en otros genes implicados en la transición epitelio-mesénquima, como *LEF1*, lo que sugiere que la regulación de este proceso es compleja. Se ha caracterizado el papel en la migración de la sobreexpresión de *LEF1* en carcinoma hepatocelular y se ha sugerido su potencial como diana terapéutica para revertir la resistencia a lenvatinib en este tipo de cáncer³³². Sería interesante profundizar en los mecanismos moleculares subyacentes a este incremento de la capacidad migratoria observado en las líneas celulares resistentes a taxanos.

5. Estudio del papel de las vesículas extracelulares en la resistencia a taxanos

Se ha descrito que las vesículas extracelulares (EVs) desempeñan un papel importante en quimiorresistencia, ya que las células tumorales resistentes pueden emplear estas partículas para transferir contenido de manera selectiva a otras células, habiéndose descrito la transferencia de proteínas importantes para la resistencia, como las bombas de eflujo, pero también de proteínas con una función contraria que no interesan a las células para el mantenimiento de la resistencia^{197,203,206}. La caracterización de las EVs liberadas por las células CAL33 y CAL33-R, demostró que, al contrario de lo descrito en la literatura, la línea celular CAL33-R liberaba un menor número de EVs de 10K y 100K en comparación con la línea celular parental. Esta es una cuestión compleja, ya que tanto el tipo de EVs, que en muchos estudios no se especifica, como el contenido de las mismas, parece ser más relevante que la concentración de partículas en sí misma³³³. Además, el hecho de que las EVs de 100K procedentes de la línea celular CAL33-R presentasen un mayor contenido proteico concuerda con la importancia de este mecanismo de comunicación intercelular en la resistencia a taxanos.

Aunque la importancia de las EVs en cáncer está clara, apenas hay estudios en CECC. Entre las vías de señalización con expresión diferencial entre las EVs de 100K procedentes de las líneas celulares CAL33 y CAL33-R se encuentra la de VEGF-VEGFR, que ha sido identificada previamente en EVs liberadas por células tumorales

resistentes a múltiples fármacos, por lo que parece tener importancia en la transferencia de este fenotipo²⁰⁵. Asimismo, se ha descrito las EVs pueden tener un papel importante en la metástasis, lo cual puede explicar la desregulación de vías de señalización como EGF-EGFR en las células CAL33-R, con mayor capacidad migratoria³³⁴.

Por otra parte, la proteína MDR1 se detectó únicamente en las EVs procedentes de las células CAL33-R. La presencia de bombas de eflujo en EVs liberadas por células resistentes ha sido descrita previamente y es considerado un método de transferencia de la resistencia a otras células tumorales^{203,204,206}. Esto confirma la liberación selectiva de contenido en las EVs por parte de las células. En el caso de MCJ (*DNAJC15*), se identificó un aumento en los niveles de expresión de esta proteína en las EVs liberadas por las células CAL33-R con respecto a la expresión intracelular, lo que podría ser debido al uso de EVs para la liberación de contenido proteico que no contribuye al fenotipo resistente a través del empaquetamiento selectivo, garantizando el establecimiento y mantenimiento de la resistencia.

Como perspectivas futuras, sería interesante cultivar células sensibles con EVs procedentes de las células resistentes a taxanos para comprobar si realmente se produce la transferencia del fenotipo resistente únicamente a través de las EVs. Caracterizar en profundidad las EVs en CECC y su papel en la resistencia a taxanos es fundamental para posteriormente evaluar su potencial como biomarcadores y dianas terapéuticas.

6. Alternativas terapéuticas en CECC resistente a taxanos

Tras determinar las alteraciones responsables de la resistencia a taxanos en las líneas celulares 32816-R y CAL33-R, se decidió analizar la respuesta a distintos agentes terapéuticos para detectar posibles resistencias cruzadas e identificar alternativas terapéuticas. En primer lugar, se estudió la sensibilidad de las células a los otros fármacos que componen la terapia TPF (5-FU y cisplatino) y a la radiación.

Nuestros resultados muestran que las líneas celulares resistentes a taxanos no presentan resistencia cruzada a 5-FU, a pesar de que en otros tumores sí ha sido descrita^{335,336}. El 5-FU no es sustrato de MDR1 y los mecanismos que median la resistencia a este fármaco son diferentes y se basan principalmente en la inhibición de la apoptosis¹³⁰.

Por otra parte, en nuestro trabajo, las líneas celulares resistentes a taxanos presentaron una mayor sensibilidad a cisplatino. Aunque en algunos estudios se ha

relacionado la sobreexpresión de MDR1 con resistencia a platinos¹³⁰, también se ha descrito un aumento de la sensibilidad a cisplatino en líneas celulares con sobreexpresión de *ABCB1* y los estudios que lo reportan sugieren que podría estar mediado por alteraciones en los transportadores de cobre y el metabolismo del glutatión³³⁷. Por otra parte, algunos ensayos funcionales ponen de manifiesto que la resistencia a cisplatino no depende de la actividad de esta bomba de eflujo^{130,338}. Además, se ha descrito que las líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a cisplatino presentan un incremento de la sensibilidad a los taxanos³³⁹. Esto confirma que los mecanismos que median la resistencia a platinos y taxanos son diferentes, siendo necesario profundizar en ellos para esclarecer las alteraciones que median la sensibilidad colateral.

Nuestro trabajo muestra como las líneas celulares resistentes a taxanos también presentan una mayor sensibilidad a radiación, aspecto que, en nuestro conocimiento, no ha sido descrito hasta el momento. Dado que ambas terapias se basan en la inducción del daño en el DNA, se realizó un ensayo COMET que probó que las células resistentes a taxanos presentaban un mayor nivel de daño basal y también una mayor inducción de este daño tras el tratamiento con cisplatino, lo que podría explicar el aumento de sensibilidad a agentes inductores de daño en el DNA observado en las líneas celulares 32816-R y CAL33-R.

Se ha descrito que los defectos en la reparación del DNA causan un incremento de la muerte celular mediada por agentes inductores de daño^{340,341}; por ello, se analizaron los cambios transcriptómicos en genes reparadores en la línea celular 32816-R con respecto a la 32816. Se observaron alteraciones en genes importantes en este proceso, como la disminución de la expresión de *XRCC2* o *NBN*, que están implicados en la reparación del DNA a través de distintas vías, tanto de reparación de doble cadena como de cadena única, lo cual probablemente incrementa el defecto en los mecanismos de reparación. De este modo, el desarrollo de resistencia a paclitaxel causa un defecto en la reparación del daño en el DNA que sensibiliza estas células a agentes inductores de daño, por lo que el cisplatino puede ser considerado un tratamiento de rescate en CECC resistente a taxanos. Hasta el momento, los estudios que asociaban el aumento de sensibilidad a cisplatino con la resistencia a taxanos se centraban en el estudio de otras alteraciones moleculares³³⁷. Sería interesante analizar esta sensibilidad cruzada a cisplatino en otros tipos de cáncer, ya que los taxanos se emplean en el tratamiento de muchos tumores y la adquisición de resistencia es un evento frecuente, por lo que son necesarias alternativas terapéuticas y terapias de rescate³⁴².

Debido al defecto en la reparación del DNA de las células resistentes a taxanos, se valoró si el olaparib podría ser una alternativa terapéutica en el CECC resistente. Este fármaco inhibe la reparación del daño a través del bloqueo de la enzima PARP. La línea celular 32816-R presenta alteraciones en diversos genes con función reparadora, pero *PARP1* no se encuentra entre ellos. Se observó un incremento de la respuesta a este fármaco en las líneas celulares resistentes a taxanos, que podría deberse al daño acumulado en el DNA que presentan estas células a nivel basal y a los otros defectos de reparación identificados. La combinación de olaparib y cisplatino ha sido estudiada en distintos tipos de cáncer, incluyendo el CECC resecable, con resultados prometedores³⁴³. Los resultados obtenidos sugieren que esta podría ser una aproximación terapéutica especialmente interesante en el CECC resistente a taxanos.

En resumen, en el presente trabajo hemos identificado dos alteraciones esenciales para el desarrollo de resistencia a taxanos en modelos celulares de CECC, la sobreexpresión de *ABCB1* y la pérdida de expresión de *DNAJC15*, y proponerlos como potenciales biomarcadores de respuesta. Además, hemos asociado la resistencia a taxanos con un aumento de sensibilidad a agentes que causan daño en el DNA, abriendo la puerta al diseño de nuevas estrategias terapéuticas en CECC resistente a taxanos, como el tratamiento combinado con agentes que inhiben la reparación del daño en el DNA como el olaparib. Asimismo, la caracterización molecular de la resistencia a taxanos en CECC llevada a cabo en este trabajo ha permitido identificar potenciales dianas terapéuticas que necesitan ser estudiadas con mayor profundidad pero que podrían mejorar el pronóstico del CECC resistente a taxanos. Nuestro estudio, en su conjunto, ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen a la resistencia a taxanos en CECC y valorar distintas opciones terapéuticas de cara a optimizar el diseño de nuevas estrategias que favorezcan la medicina de precisión, si bien es necesaria la realización de ensayos *in vivo*.



CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

1. La pérdida de *ATG7* es una alteración frecuente en el carcinoma escamoso de cabeza y cuello, causa un bloqueo de la autofagia celular y modifica la sensibilidad a paclitaxel de las células tumorales, pero no es determinante para la adquisición de resistencia al tratamiento.
2. Los tumores de pacientes que presentaron toxicidad al régimen TPF tienen más alteraciones en el número de copias y una mayor incidencia de pérdidas en el brazo cromosómico 4p, por lo que estos dos eventos podrían ser utilizados como posibles biomarcadores predictores de respuesta en carcinoma escamoso de cabeza y cuello.
3. Tanto la sobreexpresión de *ABCB1* (MDR1) como la reducción de los niveles de expresión de *DNAJC15* (MCJ) son alteraciones esenciales para la adquisición de resistencia a paclitaxel en líneas celulares de carcinoma escamoso de cabeza y cuello.
4. Las líneas celulares resistentes a taxanos liberan un menor número de vesículas extracelulares en relación con las líneas celulares parentales, pero presentan un mayor contenido proteico. La presencia de MDR1 en estas vesículas confirma que las células resistentes a taxanos pueden usar este mecanismo para transferir resistencia a fármacos a las células sensibles. Además, la expulsión selectiva de MCJ en las vesículas extracelulares de las células resistentes a taxanos podría ser otro factor importante para el establecimiento de la resistencia.
5. Las líneas celulares resistentes a taxanos mantienen la sensibilidad al 5-FU, probablemente al no ser dependiente de la bomba de eflujo MDR1.
6. La generación de resistencia a paclitaxel se asocia con un defecto en los mecanismos de reparación del DNA que aumenta la sensibilidad a tratamientos como el cisplatino y la radiación, y abre la puerta al empleo de inhibidores de la reparación, como el olaparib, en el tratamiento del carcinoma escamoso de cabeza y cuello resistente a taxanos.

CONCLUSIONS

1. Loss of *ATG7*, a frequent alteration in head and neck squamous cell carcinoma, causes a blockade of cellular autophagy and modifies the paclitaxel sensitivity of tumour cells, but is not a determinant alteration for the acquisition of taxane resistance.
2. Tumours from patients who presented toxicity to the TPF regimen showed an increase of copy number alterations and a higher incidence of chromosome arm 4p losses, so these two events could be used as predictive biomarkers of response in head and neck squamous carcinoma.
3. Both the increase of *ABCB1* (MDR1) and decrease of *DNAJC15* (MCJ) expression levels are essential alterations for the acquisition of paclitaxel resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.
4. Taxane-resistant cell lines release a lower number of extracellular vesicles when compared with the parental cell lines, but these vesicles have a higher protein content. The presence of MDR1 in these vesicles confirms that taxane-resistant cells can use this mechanism to transfer drug resistance to sensitive cells. In addition, the selective release of MCJ in the extracellular vesicles of taxane-resistant cells could be another important factor in the establishment of resistance.
5. Taxane-resistant cell lines maintain sensitivity to 5-FU, probably because it is not dependent on the MDR1 efflux pump.
6. The generation of paclitaxel resistance is associated with a defect in DNA repair mechanisms that increases sensitivity to DNA-damaging treatments such as cisplatin and radiation and opens the door to the use of repair inhibitors such as olaparib in the treatment of taxane-resistant head and neck squamous cell carcinoma.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Johnson, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Primers* **6**, 92 (2020).
2. Jou, A. & Hess, J. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat* **40**, 328–332 (2017).
3. Mesia, R. *et al.* SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clinical and Translational Oncology* **23**, 913–921 (2021).
4. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* **18**, 269–282 (2018).
5. Rothenberg, S. M. & Ellisen, L. W. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Invest* **122**, 1951 (2012).
6. Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Saginala, K. & Barsouk, A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Medical Sciences* **11**, 42 (2023).
7. Cancer Today. <https://gco.iarc.fr/today/en>.
8. ESTIMACIONES DE LA INCIDENCIA DEL CÁNCER EN ESPAÑA. Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) (2022).
9. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica. <https://seom.org/>.
10. *Las Cifras Del Cáncer En España*. SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica (2024).
11. Winn, D. M. *et al.* The INHANCE consortium: toward a better understanding of the causes and mechanisms of head and neck cancer. *Oral Dis* **21**, 685–693 (2015).
12. Bravi, F., Lee, Y. A., Hashibe, M., Boffetta, P., Conway, D. I., Ferraroni, M., La Vecchia, C., Edefonti, V., & INHANCE Consortium investigators. Lessons learned from the INHANCE consortium: An overview of recent results on head and neck cancer. *Oral Dis* **27**, 73–93 (2021).
13. Jethwa, A. R. & Khariwala, S. S. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* **36**, 411–423 (2017).
14. Li, Y. & Hecht, S. S. Carcinogenic Components of Tobacco and Tobacco Smoke: A 2022 Update. *Food Chem Toxicol* **165**, 113179 (2022).
15. Miranda-Galvis, M., Loveless, R., Kowalski, L. P. & Teng, Y. Impacts of Environmental Factors on Head and Neck Cancer Pathogenesis and Progression. *Cells* **10**, 1–16 (2021).
16. Igissin, N., Zatonskikh, V., Telmanova, Z., Tulebaev, R. & Moore, M. Laryngeal Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention: A Narrative Review. *Iran J Public Health* **52**, 2248 (2023).
17. Hashibe, M. *et al.* Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* **99**, 777–789 (2007).
18. Wyss, A. B. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in nucleotide excision repair genes, cancer treatment, and head and neck cancer survival. *Cancer Causes Control* **25**, 437 (2014).

19. Szukalska, M. *et al.* Electronic Cigarettes and Head and Neck Cancer Risk—Current State of Art. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 3274 **12**, 3274 (2020).
20. Maasland, D. H. E., van den Brandt, P. A., Kremer, B., Goldbohm, R. A. (. & Schouten, L. J. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer* **14**, 187 (2014).
21. Freedman, N. D., Abnet, C. C., Leitzmann, M. F., Hollenbeck, A. R. & Schatzkin, A. Prospective investigation of the cigarette smoking-head and neck cancer association by sex. *Cancer* **110**, 1593–1601 (2007).
22. Zandberg, D. P. *et al.* Oropharyngeal Cancer (OPC) Drives Racial Outcome Disparities in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (HNSCC): Ten Year Experience at the University of Maryland Greenebaum Cancer Center (UMGCC). *Head Neck* **38**, 564 (2016).
23. Hashibe, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **18**, 541 (2009).
24. Guha, N., Warnakulasuriya, S., Vlaanderen, J. & Straif, K. Betel quid chewing and the risk of oral and oropharyngeal cancers: A meta-analysis with implications for cancer control. *Int J Cancer* **135**, 1433–1443 (2014).
25. Boucher, B. J. & Mannan, N. Metabolic effects of the consumption of Areca catechu. *Addiction Biology* **7**, 103–110 (2002).
26. de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., & Plummer, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* **13**, 607–615 (2012).
27. Chaturvedi, A. K. *et al.* Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 4550 (2013).
28. Heck, J. E. *et al.* Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol* **39**, 166 (2010).
29. Varier, I. *et al.* Clinical characteristics and outcomes of oropharyngeal carcinoma related to high-risk non-human papillomavirus16 viral subtypes. *Head Neck* **38**, 1330–1337 (2016).
30. Lechner, M., Liu, J., Masterson, L. & Fenton, T. R. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 306 (2022).
31. Chaturvedi, A. K. *et al.* Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. *Journal of Clinical Oncology* **29**, 4294 (2011).
32. Ang, K. K. *et al.* Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* **363**, 24 (2010).
33. Elrefaey, S., Massaro, M. A., Chiocca, S., Chiesa, F. & Ansarin, M. HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* **34**, 299 (2014).
34. Zhang, S., Wang, B., Ma, F., Tong, F., Yan, B., Liu, T., Xie, H., Song, L., Yu, S., & Wei, L. Characteristics of B lymphocyte infiltration in HPV+ head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer sci* **112**, 1402–1416 (2021).
35. Tsang, C. M., Lui, V. W. Y., Bruce, J. P., Pugh, T. J. & Lo, K. W. Translational genomics of nasopharyngeal cancer. *Semin Cancer Biol* **61**, 84–100 (2020).

36. Chang, E. T., Ye, W., Zeng, Y. X. & Adami, H. O. The Evolving Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **30**, 1035–1047 (2021).
37. Tsao, S. W., Tsang, C. M. & Lo, K. W. Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **372** (2017).
38. Nokovitch, L. *et al.* Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Risk Factors: State of the Art. *J Clin Med* **12**, 3264 (2023).
39. Chieng, C. Y., Dalal, A. & Ilankovan, V. Occupational exposure and risk of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: systematic review and 25-year retrospective cohort study of patients. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **61**, 39–48 (2023).
40. Jefferies, S. *et al.* The role of genetic factors in predisposition to squamous cell cancer of the head and neck. *Br J Cancer* **79**, 865 (1999).
41. Negri, E. *et al.* FAMILY HISTORY OF CANCER: POOLED ANALYSIS IN THE INTERNATIONAL HEAD AND NECK CANCER EPIDEMIOLOGY (INHANCE) CONSORTIUM. *Int J Cancer* **124**, 394–401 (2009).
42. Cadoni, G. *et al.* A review of genetic epidemiology of head and neck cancer related to polymorphisms in metabolic genes, cell cycle control and alcohol metabolism. *Acta Otorhinolaryngologica Italica* **32**, 1 (2012).
43. Wang, Y., Yang, H., Duan, G. & Wang, H. The association of the CYP1A1 Ile462Val polymorphism with head and neck cancer risk: evidence based on a cumulative meta-analysis. *Onco Targets Ther* **9**, 2927 (2016).
44. Niu, Y. M. *et al.* Increased risks between Interleukin-10 gene polymorphisms and haplotype and head and neck cancer: a meta-analysis. *Sci Rep* **5** (2015).
45. Fang, M., Huang, W., Mo, D., Zhao, W. & Huang, R. Association of Five Snps in Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 and Cancer Susceptibility: Evidence from 67 Studies. *Cellular Physiology and Biochemistry* **47**, 414–427 (2018).
46. Fernández-Mateos, J. *et al.* Genetic Susceptibility in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Spanish Population. *Cancers (Basel)* **11**, 493 (2019).
47. Velleuer, E. & Dietrich, R. Fanconi anemia: young patients at high risk for squamous cell carcinoma. *Mol Cell Pediatr* **1**, 9 (2014).
48. Maasland, D. H. E., Van Den Brandt, P. A., Kremer, B., Goldbohm, R. A. & Schouten, L. J. Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head–neck cancer in the Netherlands Cohort Study. *Int J Cancer* **136**, E396–E409 (2015).
49. Chuang, S. C. *et al.* Diet and the Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis in the INHANCE Consortium. *Cancer Causes Control* **23**, 69 (2012).
50. Hashim, D., Genden, E., Posner, M., Hashibe, M., & Boffetta, P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol* **30**, 744–756 (2019).
51. Burcher, K. M., Burcher, J. T., Inscore, L., Bloomer, C. H., Furdui, C. M., & Porosnicu, M. A Review of the Role of Oral Microbiome in the Development, Detection, and Management of Head and Neck Squamous Cell Cancers. *Cancers* **14**, 4116 (2022).
52. Conway, D. I. *et al.* Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries. *International journal of cancer* **136**, 1125 (2015).

53. Curado, M. P. & Hashibe, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol* **21**, 194–200 (2009).
54. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. M. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* **2011 11:1** **11**, 9–22 (2010).
55. Woo, S. Bin. Oral Epithelial Dysplasia and Premalignancy. *Head Neck Pathol* **13**, 423 (2019).
56. Simple, M., Suresh, A., Das, D. & Kuriakose, M. A. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. *Oral oncol* **51**, 643–651 (2015).
57. Torezan, L. A. R. & Festa-Neto, C. Cutaneous field cancerization: clinical, histopathological and therapeutic aspects. *An Bras Dermatol* **88**, 775 (2013).
58. Graveland, A. P. *et al.* Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* **128**, 1852–1859 (2011).
59. Tumban, E. A Current Update on Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. *Viruses* **11** (2019).
60. Farah, C. S. & Farah, S. Molecular landscape of head and neck cancer and implications for therapy. *Ann Transl Med* **9**, 915 (2021).
61. Canning, M. *et al.* Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Front Cell Dev Biol* **7**, 444998 (2019).
62. Egawa, N., Egawa, K., Griffin, H. & Doorbar, J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses* **7**, 3863 (2015).
63. Matentzoglou, K. & Scheffner, M. Ubiquitin ligase E6-AP and its role in human disease. *Biochem Soc Trans* **36**, 797–801 (2008).
64. Chung, C. H. & Gillison, M. L. Human papillomavirus in head and neck cancer: Its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical Cancer Research* **15**, 6758–6762 (2009).
65. Perez-Ordóñez, B., Beauchemin, M. & Jordan, R. C. K. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* **59**, 445 (2006).
66. Rampias, T., Sasaki, C. & Psyrris, A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol* **50**, 356–363 (2014).
67. Um, S. H. *et al.* Variable expression of the forgotten oncogene E5 in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Journal of Clinical Virology* **61**, 94–100 (2014).
68. Ren, S. *et al.* HPV E2, E4, E5 drive alternative carcinogenic pathways in HPV positive cancers. *Oncogene* **39**, 6327–6339 (2020).
69. Brooks, P. J. & Theruvathu, J. A. DNA adducts from acetaldehyde: implications for alcohol-related carcinogenesis. *Alcohol* **35**, 187–193 (2005).
70. Pai, S. I. & Westra, W. H. Molecular Pathology of Head and Neck Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Annual review of pathology* **4**, 49–70 (2009).
71. Li, Q., Tie, Y., Alu, A., Ma, X. & Shi, H. Targeted therapy for head and neck cancer: signaling pathways and clinical studies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2023 8:1** **8**, 1–28 (2023).
72. Solomon, B., Young, R. J. & Rischin, D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol* **52**, 228–240 (2018).

73. Xu, M. J., Johnson, D. E. & Grandis, J. R. EGFR-Targeted Therapies in the Post-Genomic Era. *Cancer metastasis reviews* **36**, 463–473 (2017).
74. Lo, H.-W. Nuclear Mode of the EGFR Signaling Network: Biology, Prognostic Value, and Therapeutic Implications.
75. Tabatabaieifar, S., Kruse, T. A., Thomassen, M., Larsen, M. J. & Sørensen, J. A. Use of next generation sequencing in head and neck squamous cell carcinomas: A review. *Oral Oncol* **50**, 1035–1040 (2014).
76. Chung, C. H. *et al.* Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Ann Oncol* **26**, 1216 (2015).
77. Mountzios, G., Rampias, T. & Psyrri, A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Ann Oncol* **25**, 1889–1900 (2014).
78. Glorieux, M., Dok, R. & Nuyts, S. The influence of PI3K inhibition on the radiotherapy response of head and neck cancer cells. *Scientific Reports* 2020 10:1 **10**, 1–10 (2020).
79. Bruce, J. P., Yip, K., Bratman, S. V., Ito, E., & Liu, F. F. Nasopharyngeal Cancer: Molecular Landscape. *J Clin Oncol* **33**, 3346–3355 (2015).
80. Degirmenci, U., Wang, M. & Hu, J. Targeting Aberrant RAS/RAF/MEK/ERK Signaling for Cancer Therapy. *Cells* **9** (2020).
81. Ullah, R., Yin, Q., Snell, A. H. & Wan, L. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment. *Semin Cancer Biol* **85**, 123–154 (2022).
82. Ngan, H. L., Liu, Y., Fong, A. Y., Poon, P. H. Y., Yeung, C. K., Chan, S. S. M., Lau, A., Piao, W., Li, H., Tse, J. S. W., Lo, K. W., Chan, S. M., Su, Y. X., Chan, J. Y. K., Lau, C. W., Mills, G. B., Grandis, J. R., & Lui, V. W. Y. MAPK pathway mutations in head and neck cancer affect immune microenvironments and ErbB3 signaling. *Life science alliance* **3**, e201900545 (2020).
83. Lai, S. Y. & Johnson, F. M. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates* **13**, 67–78 (2010).
84. Geiger, J. L., Grandis, J. R. & Bauman, J. E. The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol* **56**, 84–92 (2016).
85. Leeman, R. J., Lui, V. W. Y. & Grandis, J. R. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* **6**, 231–241 (2006).
86. Bu, L. L. *et al.* STAT3 Induces Immunosuppression by Upregulating PD-1/PD-L1 in HNSCC. *J Dent Res* **96**, 1027 (2017).
87. Hartmann, S., Bhola, N. E. & Grandis, J. R. HGF/Met Signaling in Head and Neck Cancer: Impact on the Tumor Microenvironment. *Clin Cancer Res* **22**, 4005–4013 (2016).
88. Cho, Y. A. *et al.* Alteration status and prognostic value of MET in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer* **7**, 2197 (2016).
89. Alsahafi, E. *et al.* Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges. *Cell Death Dis* **10** (2019).
90. Didonato, J. A., Mercurio, F. & Karin, M. NF-κB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* **246**, 379–400 (2012).
91. Champion, N. J., Ally, M., Jank, B. J., Ahmed, J. & Alusi, G. The molecular march of primary and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* 2021 40:10 **40**, 1757–1774 (2021).

92. Yi, M. *et al.* Rediscovery of NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma: How genetic defects of NF- κ B pathway interplay with EBV in driving oncogenesis? *J Cell Physiol* **233**, 5537–5549 (2018).
93. Li, L. & Zhang, Z. T. Genetic Association between NFKBIA and NFKB1 Gene Polymorphisms and the Susceptibility to Head and Neck Cancer: A Meta-Analysis. *Dis Markers* **2019** (2019).
94. Oeckinghaus, A., Hayden, M. S. & Ghosh, S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunology* **12**, 695–708 (2011).
95. Yu, H., Lin, L., Zhang, Z., Zhang, H. & Hu, H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2020** **5**, 1–23 (2020).
96. Allen, C. T., Ricker, J. L., Chen, Z. & Van Waes, C. Role of activated nuclear factor- κ B in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* **29**, 959–971 (2007).
97. King, K. E. *et al.* Intersection of the p63 and NF- κ B pathways in epithelial homeostasis and disease. *Mol Carcinog* **58**, 1571–1580 (2019).
98. Fan, Y., Mao, R. & Yang, J. NF- κ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell* **4**, 176–185 (2013).
99. Lee, T. L. *et al.* A Novel Nuclear Factor- κ B Gene Signature Is Differentially Expressed in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas in Association with TP53 Status. *Clinical Cancer Research* **13**, 5680–5691 (2007).
100. Xie, J., Huang, L., Lu, Y. G. & Zheng, D. L. Roles of the Wnt Signaling Pathway in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Front Mol Biosci* **7** (2020).
101. Paluszczak, J. The Significance of the Dysregulation of Canonical Wnt Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells* **9** (2020).
102. Borggrefe, T. *et al.* The Notch intracellular domain integrates signals from Wnt, Hedgehog, TGF β /BMP and hypoxia pathways. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1863**, 303–313 (2016).
103. Patni, A. P. *et al.* Comprehending the crosstalk between Notch, Wnt and Hedgehog signaling pathways in oral squamous cell carcinoma - clinical implications. *Cellular Oncology* **2021** **44**, 473–494 (2021).
104. Lawrence, M. S. *et al.* Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582 (2015).
105. Porcheri, C. & Mitsiadis, T. A. Notch in head and neck cancer. *Adv Exp Med Biol* **1287**, 81–103 (2021).
106. Richtig, G. *et al.* Hedgehog pathway proteins SMO and GLI expression as prognostic markers in head and neck squamous cell carcinoma. *Histopathology* **75**, 118–127 (2019).
107. Faraji, F., Ramirez, S. I., Quiroz, P. Y. A., Molina-Mendez, A. N. & Gutkind, J. S. Genomic Hippo Pathway Alterations and Persistent YAP/TAZ Activation: New Hallmarks in Head and Neck Cancer. *Cells* **11** (2022).
108. Cloer, E. W., Goldfarb, D., Schrank, T. P., Weissman, B. E. & Major, M. B. NRF2 activation in cancer: from DNA to protein. *Cancer Res* **79**, 889 (2019).
109. Salvatore, D., Santoro, M. & Schlumberger, M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nature Reviews Endocrinology* **2021** **17**, 296–306 (2021).

110. Zang, J. *et al.* Prognostic value of vascular endothelial growth factor in patients with head and neck cancer: A meta-analysis. *Head Neck* **35**, 1507–1514 (2013).
111. Gollin, S. M. Cytogenetic alterations and their molecular genetic correlates in head and neck squamous cell carcinoma: A next generation window to the biology of disease. *Genes Chromosomes Cancer* **53**, 972–990 (2014).
112. Shaikh, M. H. *et al.* Chromosome 3p loss in the progression and prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncol* **109**, 104944 (2020).
113. Kim, H. A. J. *et al.* 3p arm loss and survival in head and neck cancer: An analysis of tcga dataset. *Cancers (Basel)* **13** (2021).
114. Bockmühl, U. & Petersen, I. DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Archiv* **441**, 541–550 (2002).
115. Szturz, P., Nevens, D. & Vermorken, J. B. Oligometastatic Disease Management: Finding the Sweet Spot. *Front Oncol* **10** (2020).
116. Pynnonen, M. A. *et al.* Clinical Practice Guideline: Evaluation of the Neck Mass in Adults. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery* **157**, S1–S30 (2017).
117. Syrjänen, S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci* **126 Suppl 1**, 49–66 (2018).
118. Marur, S. & Forastiere, A. A. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc* **83**, 489–501 (2008).
119. Edge, S. B. & Compton, C. C. The american joint committee on cancer: The 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol* **17**, 1471–1474 (2010).
120. Hankinson, P., Mahmood, H., Walsh, H., Speight, P. M. & Khurram, S. A. Demystifying oral epithelial dysplasia: a histological guide. *Pathology* **56**, 11–23 (2024).
121. Zanoni, D. K., Patel, S. G. & Shah, J. P. Changes in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging of Head and Neck Cancer: Rationale and Implications. *Curr Oncol Rep* **21**, 52 (2019).
122. Amin, M. B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin* **67**, 93–99 (2017).
123. Huang, S. H. & O’Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **18**, 1–13 (2017).
124. Brana, I. & Siu, L. L. Locally advanced head and neck squamous cell cancer: Treatment choice based on risk factors and optimizing drug prescription. *Ann Oncol* **23**, x178–x185 (2012).
125. Wang, H. *et al.* Locally advanced head and neck squamous cell carcinoma treatment efficacy and safety: a systematic review and network meta-analysis. *Front. Pharmacol* **14**, 1269863 (2023).
126. Bhat, G. R., Hyole, R. G. & Li, J. Head and neck cancer: Current challenges and future perspectives. *Adv Cancer Res* **152**, 67–102 (2021).
127. Chow, L. Q. M. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **382**, 60–72 (2020).
128. Pignon, J. P., Maître, A. le, Maillard, E. & Bourhis, J. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): An update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and Oncology* **92**, 4–14 (2009).

129. Budach, V. TPF Sequential Therapy: When and for Whom? *Oncologist* **15**, 13–18 (2010).
130. Kanno, Y., Chen, C. Y., Lee, H. L., Chiou, J. F. & Chen, Y. J. Molecular Mechanisms of Chemotherapy Resistance in Head and Neck Cancers. *Front Oncol* **11** (2021).
131. Zhang, Q. *et al.* Response to induction chemotherapy predicts survival outcomes in oropharyngeal cancer. *Cancer Med* **12**, 9175–9185 (2023).
132. Yamauchi, M. *et al.* Induction Chemotherapy With 5-Fluorouracil, Cisplatin, and Cetuximab in Advanced Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *In Vivo* **37**, 1275–1280 (2023).
133. Argiris, A. & Karamouzis, M. V. Empowering induction therapy for locally advanced head and neck cancer. *Ann Oncol* **22**, 773–781 (2011).
134. Rosenberg, A. J. & Vokes, E. E. Optimizing Treatment De-Escalation in Head and Neck Cancer: Current and Future Perspectives. *Oncologist* **26**, 40–48 (2021).
135. Mirghani, H. *et al.* Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: ongoing trials, critical issues and perspectives. *Int J Cancer* **136**, 1494–1503 (2015).
136. Dietz, A., Wichmann, G. & Wiegand, S. Should We De-escalate the Treatment for HPV-Positive Tumors? *Recent Results Cancer Res* **206**, 173–181 (2017).
137. Economopoulou, P., Kotsantis, I. & Psyrri, A. De-Escalating Strategies in HPV-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Viruses* **13**, 1787 (2021).
138. Forastiere, A. A., Goepfert, H., Maor, M., Pajak, T. F., Weber, R., Morrison, W., Glisson, B., Trotti, A., Ridge, J. A., Chao, C., Peters, G., Lee, D. J., Leaf, A., Ensley, J., & Cooper, J. Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. *The N Engl J Med* **349**, 2091–2098 (2003).
139. Vermorken, J. B. *et al.* Cisplatin, Fluorouracil, and Docetaxel in Unresectable Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **357**, 1695–1704 (2007).
140. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorg Chem* **88**, 102925 (2019).
141. Sethy, C. & Kundu, C. N. 5-Fluorouracil (5-FU) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **137**, 111285 (2021).
142. Longley, D. B., Harkin, D. P. & Johnston, P. G. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature Reviews Cancer* **2003** 3:5 **3**, 330–338 (2003).
143. Zhao, S., Tang, Y., Wang, R. & Najafi, M. Mechanisms of cancer cell death induction by paclitaxel: an updated review. *Apoptosis* **2022** 27:9 **27**, 647–667 (2022).
144. Khing, T. M. *et al.* The effect of paclitaxel on apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe in AGS cells. *Scientific Reports* **2021** 11:1 **11**, 1–19 (2021).
145. Yu, Y. F. *et al.* Paclitaxel induces autophagy in gastric cancer BGC823 cells. *Ultrastruct Pathol* **41**, 284–290 (2017).
146. Verweij, J., Clavel, M. & Chevalier, B. Paclitaxel (Taxol™) and docetaxel (Taxotere™): Not simply two of a kind. *Ann Oncol* **5**, 495–505 (1994).
147. Bhatia, A. & Burtneess, B. Treating Head and Neck Cancer in the Age of Immunotherapy: A 2023 Update. *Drugs* **2023** 83:3 **83**, 217–248 (2023).
148. de Sousa, L. G. & Ferrarotto, R. Pembrolizumab in the first-line treatment of advanced head and neck cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **21**, 1321–1331 (2021).

149. Chen, Y., Li, Z. Y., Zhou, G. Q. & Sun, Y. An immune-related gene prognostic index for head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research* **27**, 330–341 (2021).
150. Takahashi, S. *et al.* First-line pembrolizumab ± chemotherapy for recurrent/metastatic head and neck cancer: Japanese subgroup of KEYNOTE-048. *Int J Clin Oncol* **27**, 1805 (2022).
151. Sacco, A. G. *et al.* Pembrolizumab plus cetuximab in patients with recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma: an open-label, multi-arm, non-randomised, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **22**, 883–892 (2021).
152. Trotti, A. Toxicity in head and neck cancer: A review of trends and issues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **47**, 1–12 (2000).
153. Florea, A. M. & Büsselberg, D. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)* **3**, 1351 (2011).
154. Wang, K. & Tepper, J. E. Radiation therapy-associated toxicity: Etiology, management, and prevention. *CA Cancer J Clin* **71**, 437–454 (2021).
155. Trotti, A. *et al.* Mucositis incidence, severity and associated outcomes in patients with head and neck cancer receiving radiotherapy with or without chemotherapy: A systematic literature review. *Radiotherapy and Oncology* **66**, 253–262 (2003).
156. Walsh, L. *et al.* Toxicity of cetuximab versus cisplatin concurrent with radiotherapy in locally advanced head and neck squamous cell cancer (LAHNSCC). *Radiotherapy and Oncology* **98**, 38–41 (2011).
157. Wang, H. *et al.* Immune Checkpoint Inhibitor Toxicity in Head and Neck Cancer: From Identification to Management. *Front Pharmacol* **10** (2019).
158. Vermorken, J. B. *et al.* Platinum-Based Chemotherapy plus Cetuximab in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **359**, 1116–1127 (2008).
159. Hitt, R. *et al.* Induction chemotherapy with paclitaxel, cisplatin and 5-fluorouracil for squamous cell carcinoma of the head and neck: long-term results of a phase II trial. *Ann Oncol* **13**, 1665–1673 (2002).
160. Posner, M. R. *et al.* Cisplatin and Fluorouracil Alone or with Docetaxel in Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* **357**, 1705–1715 (2007).
161. Vasan, N., Baselga, J. & Hyman, D. M. A view on drug resistance in cancer. *Nature* **575**, 299–309 (2019).
162. Xuelei, M. *et al.* ERCC1 plays an important role in predicting survival outcomes and treatment response for patients with HNSCC: A meta-analysis. *Oral Oncol* **51**, 483–492 (2015).
163. Chiu, T. J. *et al.* High ERCC1 expression predicts cisplatin-based chemotherapy resistance and poor outcome in unresectable squamous cell carcinoma of head and neck in a betel-chewing area. *J Transl Med* **9**, 31 (2011).
164. Wyatt, M. D. & Wilson, D. M. Participation of DNA repair in the response to 5-fluorouracil. *Cell Mol Life Sci* **66**, 788 (2009).
165. Fletcher, J. I., Haber, M., Henderson, M. J. & Norris, M. D. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nature Reviews Cancer* **10**, 147–156 (2010).
166. Safaei, R., Holzer, A. K., Katano, K., Samimi, G. & Howell, S. B. The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs. *J Inorg Biochem* **98**, 1607–1613 (2004).

167. Kuo, M. T., Chen, H. H. W., Song, I. S., Savaraj, N. & Ishikawa, T. The roles of copper transporters in cisplatin resistance. *Cancer and Metastasis Reviews* **26**, 71–83 (2007).
168. Shi, X. *et al.* Targeting the Bcl-2 family and P-glycoprotein reverses paclitaxel resistance in human esophageal carcinoma cell line. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **90**, 897–905 (2017).
169. Maloney, S. M., Hoover, C. A., Morejon-Lasso, L. V. & Prosperi, J. R. Mechanisms of Taxane Resistance. *Cancers (Basel)* **12**, 1–57 (2020).
170. Hou, Y. *et al.* The FOXM1–ABCC5 axis contributes to paclitaxel resistance in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cell Death Dis* **8**, e2659 (2017).
171. Roy, S. *et al.* Role of β -catenin in cisplatin resistance, relapse and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma. *Cellular Oncology* **41**, 185–200 (2018).
172. Salvesen, G. S. & Duckett, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2002** 3:6 **3**, 401–410 (2002).
173. Fulda, S. & Vucic, D. Targeting IAP proteins for therapeutic intervention in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012** 11:2 **11**, 109–124 (2012).
174. Li, R. *et al.* Expression and clinical significance of Apollon in esophageal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* **14**, 1933–1940 (2016).
175. Yang, X. H. *et al.* XIAP Is a Predictor of Cisplatin-Based Chemotherapy Response and Prognosis for Patients with Advanced Head and Neck Cancer. *PLoS One* **7**, e31601 (2012).
176. Tanimoto, T. *et al.* Nuclear expression of cIAP-1, an apoptosis inhibiting protein, predicts lymph node metastasis and poor patient prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* **224**, 141–151 (2005).
177. Li, H., Huang, J., Yu, S. & Lou, Z. Long Non-Coding RNA DLEU1 Up-Regulates BIRC6 Expression by Competitively Sponging miR-381-3p to Promote Cisplatin Resistance in Nasopharyngeal Carcinoma. *OncoTargets and therapy* **13**, 2037–2045 (2020).
178. Nagata, M. *et al.* Overexpression of cIAP2 contributes to 5-FU resistance and a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **105**, 1322 (2011).
179. Mita, A. C., Mita, M. M., Nawrocki, S. T. & Giles, F. J. Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics. *Clinical Cancer Research* **14**, 5000–5005 (2008).
180. Khan, Z. *et al.* Oxaliplatin-mediated Inhibition of Survivin Increases Sensitivity of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines to Paclitaxel. *Curr Cancer Drug Targets* **10**, 660–669 (2010).
181. Liu, Y., Li, G., Liu, C., Tang, Y. & Zhang, S. RSF1 regulates the proliferation and paclitaxel resistance via modulating NF- κ B signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* **8**, 354 (2017).
182. Garg, H., Suri, P., Gupta, J. C., Talwar, G. P. & Dubey, S. Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int* **16**, 49 (2016).
183. Kato, T. *et al.* ETS1 promotes chemoresistance and invasion of paclitaxel-resistant, hormone-refractory PC3 prostate cancer cells by up-regulating MDR1 and MMP9 expression. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 966–971 (2012).
184. Diaz Osterman, C. J. *et al.* FAK activity sustains intrinsic and acquired ovarian cancer resistance to platinum chemotherapy. *Elife* **8**, (2019).

185. Canel, M. *et al.* Overexpression of Focal Adhesion Kinase in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Is Independent of fak Gene Copy Number. *Clinical Cancer Research* **12**, 3272–3279 (2006).
186. Sulzmaier, F. J., Jean, C. & Schlaepfer, D. D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. *Nat Rev Cancer* **14**, 598 (2014).
187. Nussinov, R., Tsai, C. J. & Jang, H. A New View of Pathway-Driven Drug Resistance in Tumor Proliferation. *Trends Pharmacol Sci* **38**, 427–437 (2017).
188. Li, Y. J. *et al.* Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin J Cancer* **36**, 52 (2017).
189. Kamath, K., Wilson, L., Cabral, F. & Jordan, M. A. β III-tubulin induces paclitaxel resistance in association with reduced effects on microtubule dynamic instability. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 12902–12907 (2005).
190. Nienstedt, J. C. *et al.* High-level β III-tubulin overexpression occurs in most head and neck cancers but is unrelated to clinical outcome. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **46**, 986–990 (2017).
191. Mizumachi, T., Suzuki, S., Naito, A., Carcel-Trullols, J., Evans, T. T., Spring, P. M., Oridate, N., Furuta, Y., Fukuda, S., & Higuchi, M. Increased mitochondrial DNA induces acquired docetaxel resistance in head and neck cancer cells. *Oncogene* **27(6)**, 831–838 (2008).
192. van Eijk, M., Boosman, R. J., Schinkel, A. H., Huitema, A. D. R. & Beijnen, J. H. Cytochrome P450 3A4, 3A5, and 2C8 expression in breast, prostate, lung, endometrial, and ovarian tumors: relevance for resistance to taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol* **84**, 487 (2019).
193. Pucci, P., Rescigno, P., Sumanasuriya, S., de Bono, J. & Crea, F. Hypoxia and Noncoding RNAs in Taxane Resistance. *Trends Pharmacol Sci* **39**, 695–709 (2018).
194. Xia, Y., Jiang, L. & Zhong, T. The role of HIF-1 α in chemo-/radioresistant tumors. *Onco Targets Ther* **11**, 3003 (2018).
195. Das, V., Štěpánková, J., Hajdúch, M. & Miller, J. H. Role of tumor hypoxia in acquisition of resistance to microtubule-stabilizing drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1855**, 172–182 (2015).
196. Zhang, Z. *et al.* High Notch1 expression affects chemosensitivity of head and neck squamous cell carcinoma to paclitaxel and cisplatin treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **118**, 109306 (2019).
197. Xavier, C. P. R. *et al.* The Role of Extracellular Vesicles in the Hallmarks of Cancer and Drug Resistance. *Cells* **9** (2020).
198. Welsh, J. A. *et al.* Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* **13** (2024).
199. Chen, B., Leung, L. L., Qu, X. & Chan, J. Y. K. Extracellular Vesicles as Biomarkers in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: From Diagnosis to Disease-Free Survival. *Cancers (Basel)* **15** (2023).
200. Zhou, E. *et al.* Circulating extracellular vesicles are effective biomarkers for predicting response to cancer therapy. *EBioMedicine* **67** (2021).
201. Urabe, F. *et al.* Extracellular vesicles as biomarkers and therapeutic targets for cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* **318**, C29–C39 (2020).

202. Lopes-Rodrigues, V. *et al.* Identification of the metabolic alterations associated with the multidrug resistant phenotype in cancer and their intercellular transfer mediated by extracellular vesicles. *Scientific Reports* 2017 7:1 **7**, 1–17 (2017).
203. Sousa, D., Lima, R. T. & Vasconcelos, M. H. Intercellular Transfer of Cancer Drug Resistance Traits by Extracellular Vesicles. *Trends Mol Med* **21**, 595–608 (2015).
204. Xavier, C. P. R. *et al.* The role of extracellular vesicles in the transfer of drug resistance competences to cancer cells. *Drug Resistance Updates* **62**, 100833 (2022).
205. Polónia, B., Xavier, C. P. R., Kopecka, J., Riganti, C. & Vasconcelos, M. H. The role of Extracellular Vesicles in glycolytic and lipid metabolic reprogramming of cancer cells: Consequences for drug resistance. *Cytokine Growth Factor Rev* **73**, 150–162 (2023).
206. Namee, N. M. & O'Driscoll, L. Extracellular vesicles and anti-cancer drug resistance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1870**, 123–136 (2018).
207. Khoo, X. H., Paterson, I. C., Goh, B. H. & Lee, W. L. Cisplatin-Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma: Regulation by Tumor Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Cancers (Basel)* **11** (2019).
208. Liu, T. *et al.* Exosomes containing miR-21 transfer the characteristic of cisplatin resistance by targeting PTEN and PDCD4 in oral squamous cell carcinoma. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **49**, 808–816 (2017).
209. Qin, X. *et al.* Exosomal miR-196a derived from cancer-associated fibroblasts confers cisplatin resistance in head and neck cancer through targeting CDKN1B and ING5. *Genome Biol* **20**, 1–21 (2019).
210. Wang, X. *et al.* The roles of extracellular vesicles in the development, microenvironment, anticancer drug resistance, and therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 2021 40:1 **40**, 1–16 (2021).
211. Klionsky, D. J. *et al.* Autophagy in major human diseases. *EMBO J* **40**, 108863 (2021).
212. Li, F. *et al.* Autophagy modulation in bladder cancer development and treatment. *Oncol Rep* **42**, 1647 (2019).
213. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* **221**, 3 (2010).
214. Debnath, J., Gammoh, N. & Ryan, K. M. Autophagy and autophagy-related pathways in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023 24:8 **24**, 560–575 (2023).
215. Pyo, J. O., Nah, J. & Jung, Y. K. Molecules and their functions in autophagy. *Experimental & Molecular Medicine* 2012 44:2 **44**, 73–80 (2012).
216. Collier, J. J., Suomi, F., Oláhová, M., McWilliams, T. G. & Taylor, R. W. Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Mol Med* **13** (2021).
217. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **36**, 2503–2518 (2004).
218. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 and autophagy. *Methods in Molecular Biology* **445**, 77–88 (2008).
219. Mizushima, N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* **21**, 2861–2873 (2007).
220. Huang, J. *et al.* LC3B, a Protein That Serves as an Autophagic Marker, Modulates Angiotensin II-induced Myocardial Hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* **66**, 576–583 (2015).

221. Bjørkøy, G. *et al.* Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* **452**, 181–197 (2009).
222. Shimizu, S., Arakawa, S. & Nishida, Y. Autophagy takes an alternative pathway. *Autophagy* **6**, 290–291 (2010).
223. Urbańska, K. & Orzechowski, A. The Secrets of Alternative Autophagy. *Cells* **10** (2021).
224. Lee, I. H. *et al.* Atg7 Modulates p53 Activity to Regulate Cell Cycle and Survival During Metabolic Stress. *Science* **336**, 225 (2012).
225. Shintani, T. & Klionsky, D. J. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword. *Science* **306**, 990 (2004).
226. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
227. Sannigrahi, M. K., Singh, V., Sharma, R., Panda, N. K. & Khullar, M. Role of autophagy in head and neck cancer and therapeutic resistance. *Oral Dis* **21**, 283–291 (2015).
228. Qu, X. *et al.* Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809–1820 (2003).
229. Laddha, S. V., Ganesan, S., Chan, C. S. & White, E. Mutational Landscape of the Essential Autophagy Gene BECN1 in Human Cancers. *Mol Cancer Res* **12**, 485 (2014).
230. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15077 (2003).
231. Liang, X. H. *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–676 (1999).
232. Lebovitz, C. B., Bortnik, S. B. & Gorski, S. M. Here, there be dragons: charting autophagy-related alterations in human tumors. *Clin Cancer Res* **18**, 1214–1226 (2012).
233. Takamura, A. *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* **25**, 795 (2011).
234. Tasdemir, E. *et al.* Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nature Cell Biology* **10**, 676–687 (2008).
235. Mathew, R. *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* **21**, 1367–1381 (2007).
236. Karantza-Wadsworth, V. *et al.* Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* **21**, 1621 (2007).
237. Cassidy, L. D. & Narita, M. Autophagy at the intersection of aging, senescence, and cancer. *Mol Oncol* **16**, 3259 (2022).
238. Young, A. R. J. *et al.* Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* **23**, 798 (2009).
239. Fujii, S. *et al.* Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci* **99**, 1813–1819 (2008).
240. Guo, J. Y., Chen, H. Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A. M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J. J., Chen, G., Lemons, J. M., Karantza, V., Collier, H. A., Dipaola, R. S., Gelinas, C., Rabinowitz, J. D., & White, E. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes & development* **25**(5), 460–470 (2011).

241. Yang, A. *et al.* Autophagy is critical for pancreatic tumor growth and progression in tumors with p53 alterations. *Cancer Discov* **4**, 905 (2014).
242. Rosenfeldt, M. T. *et al.* p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**:7479 **504**, 296–300 (2013).
243. Pavlova, N. N., Zhu, J. & Thompson, C. B. THE HALLMARKS OF CANCER METABOLISM: STILL EMERGING. *Cell Metab* **34**, 355 (2022).
244. Marsh, T., Tolani, B. & Debnath, J. The pleiotropic functions of autophagy in metastasis. *J Cell Sci* **134** (2021).
245. Aqbi, H. F. *et al.* Autophagy-deficient breast cancer shows early tumor recurrence and escape from dormancy. *Oncotarget* **9**, 22113 (2018).
246. Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell* **147**, 275 (2011).
247. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. EMERGING BIOLOGICAL PRINCIPLES OF METASTASIS. *Cell* **168**, 670 (2017).
248. Mathew, R. *et al.* Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* **137**, 1062–1075 (2009).
249. Komatsu, M. Potential role of p62 in tumor development. *Autophagy* **7**, 1088–1090 (2011).
250. Cosway, B. & Lovat, P. The role of autophagy in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* **54**, 1–6 (2016).
251. Wang, Y. *et al.* Decrease of autophagy activity promotes malignant progression of tongue squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **42**, 557–564 (2013).
252. Sakakura, K. *et al.* Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **106**, 1 (2015).
253. Liu, J. L. *et al.* Prognostic significance of p62/SQSTM1 subcellular localization and LC3B in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **111**, 944 (2014).
254. Wan, X. B. *et al.* Elevated Beclin 1 expression is correlated with HIF-1alpha in predicting poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *Autophagy* **6**, 395–404 (2010).
255. Sui, X. *et al.* Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death & Disease* **4**:10 **4**, e838–e838 (2013).
256. Anderson, A. & O'Sullivan, J. The two faces of autophagy in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* **134**, 105321 (2022).
257. Škubník, J., Svobodová Pavlíčková, V., Ruml, T. & Rimpelová, S. Autophagy in cancer resistance to paclitaxel: Development of combination strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **161**, 114458 (2023).
258. Coley, H. M. Development of drug-resistant models. *Methods Mol Med* **88**, 267–273 (2004).
259. ISCN 2020: An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2020). *ISCN 2020* (2020) doi:10.1159/ISBN.978-3-318-06867-2.
260. Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G. & Clayton, A. Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Curr Protoc Cell Biol* **30**, 3.22.1-3.22.29 (2006).
261. Mojica, F. J. M. & Rodriguez-Valera, F. The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *FEBS J* **283**, 3162–3169 (2016).

262. Doudna, J. A. & Charpentier, E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* **346** (2014).
263. Mengstie, M. A. & Wondimu, B. Z. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics* **15**, 353 (2021).
264. Addgene: A better way to share science. <https://www.addgene.org/>.
265. González, M. *et al.* Microtubule Destabilizing Sulfonamides as an Alternative to Taxane-Based Chemotherapy. *Int J Mol Sci* **22**, 1–21 (2021).
266. UCSC Genome Browser Home. <http://genome.ucsc.edu>.
267. Lee, J., Jo, S. & Lee, J. Robust sparse Bayesian infinite factor models. *Comput Stat* **37**, 2693–2715 (2022).
268. Hatle, K. M. *et al.* MCJ/DnaJC15, an endogenous mitochondrial repressor of the respiratory chain that controls metabolic alterations. *Mol Cell Biol* **33**, 2302–2314 (2013).
269. Galletti, E., Magnani, M., Renzulli, M. L. & Botta, M. Paclitaxel And Docetaxel Resistance: Molecular Mechanisms and Development of New Generation Taxanes. *ChemMedChem* **2**, 920–942 (2007).
270. Hashemi, M. *et al.* Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **160**, 114392 (2023).
271. Shimura, T. *et al.* The Impact of Cross-Resistance Between Paclitaxel and Docetaxel for Metastatic Gastric Cancer. *Onkologie* **35**, 176–183 (2012).
272. Lukow, D. A. *et al.* Chromosomal instability accelerates the evolution of resistance to anti-cancer therapies. *Dev Cell* **56**, 2427 (2021).
273. Galofré, C. *et al.* Tetraploidy-Associated Genetic Heterogeneity Confers Chemo-Radiotherapy Resistance to Colorectal Cancer Cells. *Cancers (Basel)* **12** (2020).
274. Suzuki, A. *et al.* Frequent gains on chromosome arms 1q and/or 8q in human endometrial cancer. *Hum Genet* **100**, 629–636 (1997).
275. Orsetti, B. *et al.* Genetic profiling of chromosome 1 in breast cancer: mapping of regions of gains and losses and identification of candidate genes on 1q. *Br J Cancer* **95**, 1439–1447 (2006).
276. Luo, S., Su, T., Zhou, X., Hu, W. X. & Hu, J. Chromosome 1 instability in multiple myeloma: Aberrant gene expression, pathogenesis, and potential therapeutic target. *FASEB J* **36** (2022).
277. Marzin, Y. *et al.* Chromosome 1 Abnormalities in Multiple Myeloma. *Anticancer Res* **26**, 953–959 (2006).
278. Chiang, Y. C. *et al.* Establishment of a New Ovarian Cancer Cell Line CA5171. *Reproductive Sciences* **22**, 725 (2015).
279. Andersson, E., Swärd, C., Stenman, G., Ahlman, H. & Nilsson, O. High-resolution genomic profiling reveals gain of chromosome 14 as a predictor of poor outcome in ileal carcinoids. *Endocr Relat Cancer* **16**, 953–966 (2009).
280. Mutirangura, A., Pornthanakasem, W., Sriuranpong, V., Supiyaphun, P. & Voravud, N. Loss of heterozygosity on chromosome 14 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* **78(2)**, 153–156 (1998).
281. Lanzi, C. *et al.* Cell cycle checkpoint efficiency and cellular response to paclitaxel in prostate cancer cells. *Prostate* **48**, 254–264 (2001).

282. Replogle, J. M. *et al.* Aneuploidy increases resistance to chemotherapeutics by antagonizing cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 30566–30576 (2020).
283. Gollin, S. M. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* **23**, 238–253 (2001).
284. Ye, H. *et al.* Genomic assessments of the frequent loss of heterozygosity region on 8p21.3-p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet* **176**, 100–106 (2007).
285. Jin, Y., Jin, C., Wennerberg, J., Höglund, M. & Mertens, F. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 8 rearrangements in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* **130**, 111–117 (2001).
286. Li, X. *et al.* Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* **86**, 1524–1529 (1994).
287. Villepelet, A. *et al.* Effects of tobacco abuse on major chromosomal instability in human papilloma virus 16-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* **55**, 527–535 (2019).
288. Mandelbaum, J. *et al.* Identification of a lung cancer cell line deficient in atg7-dependent autophagy. *Autophagy* **2015**, 255 (2015).
289. Long, J. S. *et al.* ATG7 is a haploinsufficient repressor of tumor progression and promoter of metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119** (2022).
290. Zhang, P. *et al.* ATG7-dependent and independent autophagy determine the type of treatment in lung cancer. *Pharmacol Res* **163** (2021).
291. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* **17**, 1–382 (2021).
292. O'Prey, J. *et al.* Application of CRISPR/Cas9 to Autophagy Research. *Methods Enzymol* **588**, 79–108 (2017).
293. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
294. Tao, Z. *et al.* The repertoire of copy number alteration signatures in human cancer. *Brief Bioinform* **24**, 1–15 (2023).
295. Marin, J. J. G. *et al.* Molecular Bases of Drug Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* **12**, 1–26 (2020).
296. Olive, K. P. *et al.* Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* **324**, 1457–1461 (2009).
297. BeLow, M. & Osipo, C. Notch Signaling in Breast Cancer: A Role in Drug Resistance. *Cells* **9** (2020).
298. Zhang, H. *et al.* The Hedgehog signaling pathway promotes chemotherapy resistance via multidrug resistance protein 1 in ovarian cancer. *Oncol Rep* **44**, 2610–2620 (2020).
299. Hieronymus, H. *et al.* Tumor copy number alteration burden is a pan-cancer prognostic factor associated with recurrence and death. *Elife* **7** (2018).
300. Zhang, L., Feizi, N., Chi, C. & Hu, P. Association Analysis of Somatic Copy Number Alteration Burden With Breast Cancer Survival. *Front Genet* **9** (2018).
301. Jin, C. *et al.* Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet* **132**, 85–96 (2002).

302. Inaba, T., Honda, H. & Matsui, H. The enigma of monosomy 7. *Blood* **131**, 2891–2898 (2018).
303. Jerez, A. *et al.* Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood* **119**, 6109–6117 (2012).
304. Bièche, I. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 7q and aggressive primary breast cancer. *Lancet* **339**, 139–143 (1992).
305. Cuenca, A. *et al.* The C7orf43/TRAPPC14 component links the TRAPPII complex to Rabin8 for preciliary vesicle tethering at the mother centriole during ciliogenesis. *J Biol Chem* **294**, 15418–15434 (2019).
306. Chen, S. *et al.* Identification of a Novel Drug Sensitivity Biomarker SUMF2 for Carfilzomib/Bortezomib Dual-Drug Resistance MM. *Blood* **140**, 7150–7151 (2022).
307. Van Den Heuvel-Eibrink, M. M. *et al.* MDR1 expression in poor-risk acute myeloid leukemia with partial or complete monosomy 7. *Leukemia* **15**, 398–405 (2001).
308. Alessandrini, F., Pezzè, L., Menendez, D., Resnick, M. A. & Ciribilli, Y. ETV7-Mediated DNAJC15 Repression Leads to Doxorubicin Resistance in Breast Cancer Cells. *Neoplasia* **20**, 857–870 (2018).
309. Hatle, K. M. *et al.* Methylation-controlled J protein promotes c-Jun degradation to prevent ABCB1 transporter expression. *Mol Cell Biol* **27**, 2952–2966 (2007).
310. Chatterjee, A., Chattopadhyay, D. & Chakrabarti, G. miR-17-5p Downregulation Contributes to Paclitaxel Resistance of Lung Cancer Cells through Altering Beclin1 Expression. *PLoS One* **9** (2014).
311. Simpson, W. G. The calcium channel blocker verapamil and cancer chemotherapy. *Cell Calcium* **6**, 449–467 (1985).
312. Robey, R. W. *et al.* Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer. *Nat Rev Cancer* **18**, 452–464 (2018).
313. Tamaki, A., Ierano, C., Szakacs, G., Robey, R. W. & Bates, S. E. The controversial role of ABC transporters in clinical oncology. *Essays Biochem* **50**, 209–232 (2011).
314. Amiri-Kordestani, L., Basseville, A., Kurdziel, K., Fojo, A. T. & Bates, S. E. Targeting MDR in breast and lung cancer: discriminating its potential importance from the failure of drug resistance reversal studies. *Drug Resist Updat* **15**, 50–61 (2012).
315. Chen, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett* **370**, 153–164 (2016).
316. Schwartz, L., Supuran, C. & Alfarouk, K. The Warburg Effect and the Hallmarks of Cancer. *Anticancer Agents Med Chem* **17**, 164–170 (2017).
317. Icard, P. *et al.* How the Warburg effect supports aggressiveness and drug resistance of cancer cells? *Drug Resist Updat* **38**, 1–11 (2018).
318. Liu, C., Jin, Y. & Fan, Z. The Mechanism of Warburg Effect-Induced Chemoresistance in Cancer. *Front Oncol* **11** (2021).
319. Giddings, E. L. *et al.* Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nature Communications* 2021 12:1 **12**, 1–19 (2021).
320. Huang, J. *et al.* Clinical evaluation of targeted arterial perfusion of verapamil and chemotherapeutic drugs in interventional therapy of advanced lung cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **72**, 889–896 (2013).

321. Ries, F. & Dicato, M. Treatment of advanced and refractory breast cancer with doxorubicin, vincristine and continuous infusion of verapamil. A phase I-II clinical trial. *Med Oncol Tumor Pharmacother* **8**, 39–43 (1991).
322. Liu, Y. *et al.* Clinical efficacy of chemotherapy combined with verapamil in metastatic colorectal patients. *Cell Biochem Biophys* **61**, 393–398 (2011).
323. Pereira, E., Teodori, E., Dei, S., Gualtieri, F. & Garnier-Suillerot, A. Reversal of multidrug resistance by verapamil analogues. *Biochem Pharmacol* **50**, 451–457 (1995).
324. Wang, X. *et al.* Metabolomics analysis of multidrug resistance in colorectal cancer cell and multidrug resistance reversal effect of verapamil. *Biomed Chromatogr* **35** (2021).
325. Zhao, L. *et al.* Verapamil inhibits tumor progression of chemotherapy-resistant pancreatic cancer side population cells. *Int J Oncol* **49**, 99 (2016).
326. Belpomme, D. *et al.* Verapamil increases the survival of patients with anthracycline-resistant metastatic breast carcinoma. *Ann Oncol* **11**, 1471–1476 (2000).
327. Jiménez, N. *et al.* Cell Plasticity-Related Phenotypes and Taxanes Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol* **10**, 594023 (2020).
328. Wu, X. *et al.* Sialyltransferase ST3GAL1 promotes cell migration, invasion, and TGF- β 1-induced EMT and confers paclitaxel resistance in ovarian cancer. *Cell Death Dis* **9** (2018).
329. Hashemi, M. *et al.* EMT mechanism in breast cancer metastasis and drug resistance: Revisiting molecular interactions and biological functions. *Biomed Pharmacother* **155** (2022).
330. Wei, X. *et al.* Exosomal lncRNA NEAT1 induces paclitaxel resistance in breast cancer cells and promotes cell migration by targeting miR-133b. *Gene* **860** (2023).
331. Li, J. *et al.* KRT17 confers paclitaxel-induced resistance and migration to cervical cancer cells. *Life Sci* **224**, 255–262 (2019).
332. Li, X. *et al.* Targeting LEF1-mediated epithelial-mesenchymal transition reverses lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs* **42**, 185–195 (2024).
333. Sousa, D. *et al.* Different ability of multidrug-resistant and-sensitive counterpart cells to release and capture extracellular vesicles. *Cells* **10** (2021).
334. Becker, A. *et al.* Extracellular vesicles in cancer: cell-to-cell mediators of metastasis. *Cancer Cell* **30**, 836 (2016).
335. Aldonza, M. B. D., Hong, J. Y., Alinsug, M. V., Song, J. & Lee, S. K. Multiplicity of acquired cross-resistance in paclitaxel-resistant cancer cells is associated with feedback control of TUBB3 via FOXO3a-mediated ABCB1 regulation. *Oncotarget* **7**, 34395 (2016).
336. Fu, L. *et al.* Generation and characterization of a paclitaxel-resistant human gastric carcinoma cell line. *Anticancer Drugs* **29**, 491–502 (2018).
337. Doherty, B. *et al.* Collateral sensitivity to cisplatin in KB-8-5-11 drug-resistant cancer cells. *Anticancer Res* (2014).
338. Ren, L., Xiao, L., Hu, J., Li, Z. & Wang, Z. MDR1 and MDR3 genes and drug resistance to cisplatin of ovarian cancer cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **27**, 721–724 (2007).
339. Perego, P. *et al.* Ovarian cancer cisplatin-resistant cell lines: multiple changes including collateral sensitivity to Taxol. *Ann Oncol* **9**, 423–430 (1998).
340. Makovec, T. & Makovec, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. *Radiol Oncol* **53**, 148–158 (2019).

- 341. Kiss, R. C., Xia, F. & Acklin, S. Targeting DNA Damage Response and Repair to Enhance Therapeutic Index in Cisplatin-Based Cancer Treatment. *Int J Mol Sci* **22** (2021).
- 342. Mosca, L., Ilari, A., Fazi, F., Assaraf, Y. G. & Colotti, G. Taxanes in cancer treatment: Activity, chemoresistance and its overcoming. *Drug Resist Updat* **54** (2021).
- 343. Moutafi, M. *et al.* Phase II Window Study of Olaparib Alone or with Cisplatin or Durvalumab in Operable Head and Neck Cancer. *Cancer research communications* **3**, 1514–1523 (2023).
- 344. Ovejero-Sánchez, M. *et al.* Panobinostat Synergistically Enhances the Cytotoxicity of Microtubule Destabilizing Drugs in Ovarian Cancer Cells. *Int J Mol Sci* **23** (2022).