

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR



TESIS DOCTORAL

**NUEVAS APROXIMACIONES EN EL  
ESTUDIO DE LA RUTA AUTOFÁGICA EN  
CÁNCER COLORRECTAL**

VANESSA RIVERO PERDOMO



**ABREVIATURAS**

**ADC:** Adenocarcinomas  
**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**AhR:** Aryl Hydrocarbon Receptor  
**AIF:** *Apoptosis-inducing factor*  
**AJCC:** American Joint Committee on Cancer  
**AMPS:** persulfato de amonio  
**APC:** Adenomatous Polyposis Coli  
**ARNT:** Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator  
**ATGs:** Autophagy Related Genes  
**bHLH-PAS:** Basic hélix-loop-helix/Per-ARNT-Sim  
**BNIP3:** BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3  
**BSA:** Bovine Serum Albumin  
**CAMKK2:** calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2  
**CCR:** Cáncer Colorrectal  
**CHRPE:** Hipertrofia Congénita del Epitelio Pigmentario de la Retina  
**CIAA:** cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1  
**CQ:** Cloroquina  
**ddH<sub>2</sub>O:** agua bidestilada estéril  
**DMEM:** Dubelcco's Modified Eagle Medium  
**Deptor:** DEP-domain-containing mTOR-interacting protein  
**DMSO:** dimetilsulfóxido  
**dNTPs:** Desoxinucleótidos trifosfatos  
**EMT:** *Epithelial-Mesenchymal Transition*  
**FBS:** suero fetal bovino  
**FIH:** Factor Inhibiting HIF  
**FIP200:** Focal adhesion kinase familyinteracting protein 200Kd  
**HCQ:** Hidroxicloroquina  
**HIF-1:** Hypoxia Inducible Factor  
**HRE:** Hypoxia Response Element  
**HRP:** peroxidasa de rábano  
**IMS:** Inestabilidad de Microsatélites  
**INC:** Inestabilidad Cromosómica  
**LAMP-2A:** lysosome associated membrane protein 2  
**LDH:** lactato deshidrogenasa  
**mLST8:** mammalian Lethal with Sec13 protein 8  
**MMR:** Mismatch Repair  
**MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio  
**mTOR:** Mammalian Target of Rapamycin  
**NAD:** *nicotinamide adenine dinucleotide*  
**O<sub>2</sub>:** Oxígeno  
**ODDD:** Oxygendependent Degradation Domain  
**OMS:** Organización Mundial de Salud  
**PAF:** Poliposis Adenomatosa Familiar  
**PAFA:** Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada  
**PAM:** Poliposis Adenomatosa asociada al gen MYH  
**PBS:** tampón fosfato salino  
**PCR:** reacción en cadena de la polimerasa  
**PHD:** Prolyl-Hydroxylase Domain

## ABREVIATURAS

---

**PI:** fosfatidil-inositol  
**PI3P:** fosfatidilinositol 3-fosfato  
**PIKKs:** fosfoinosítido- 3-quinasa  
**PMSF:** fenilmetilsulfonilo  
**PRAS40:** ProlineRich AKT Substrate 40 kDa  
**pVHL:** Proteína supresora de tumores von Hippel-Lindau  
**RAPTOR:** Regulatory-Associated Protein of mTOR  
**REDECAN:** Red Española de Registros de Cáncer  
**REDD1:** Protein Regulated in Development and DNA Damage Response 1  
**RHEB:** Ras homolog enriched in brain  
**RICTOR:** Rapamycin-Insensitive Companion of Mammalian Target of Rapamycin  
**ROS:** Reactive Oxygen Species  
**SDS:** dodecilsulfato sódico  
**SDH:** succinato deshidrogenasa celular  
**SL:** Síndrome de Lynch  
**SNP:** Single Nucleotide Polymorphism  
**TAD:** Trans-Activation Domain  
**TBS-T:** *Tris buffered saline with Tween, 0,1 % tween-20*  
**TEMED:** N, N, N',N'-tetrametiletilenodiamina  
**TNM:** tumor node metastasis  
**TSC1/2:** Tuberous Sclerosis Complex  
**UE:** Unión Europea  
**ULK1:** Unc-51-like kinase 1  
**UPR:** Unfolded Protein Response  
**5-FU:** 5-fluorouracilo



Introducción	13
1. Cáncer colorrectal	14
1.2 Etiología del CCR	16
1.2.1 Edad	16
1.2.2. Factores ambientales	16
1.2.3 Factores genéticos	18
1.2.3.1 Síndromes hereditarios de predisposición al CCR	18
2. Cáncer colorrectal y carcinogénesis	24
2.1. Tumores de inestabilidad cromosómica	25
2.2. Tumores con inestabilidad de microsatélites	25
2.3. Tumores con fenotipo metilador de islas CpG	26
3. Metabolismo tumoral	26
3.1 Hipoxia	27
3.2 Proteína HIF-1	27
3.3 Regulación de la señalización de HIF-1 $\alpha$	29
3.4 Hipoxia y activación de la autofagia	31
4. Autofagia	32
4.1 Bases moleculares de la autofagia	33
4.2 Señalización de la autofagia	34
5. Autofagia y Cáncer	38
6. Moduladores de la autofagia	40
6.1 Activadores autofágicos	40
6.2 Inhibidores autofágicos	41
Hipótesis y objetivos	44
Materiales y métodos	45
1. Pacientes y controles	46
2. Extracción de DNA	46
3. Discriminación alélica por sondas Taqman <sup>tm</sup>	47
4. Líneas celulares tumorales	50
5. Cultivo de líneas celulares tumorales	51
6. Fármacos	51
7. Contaje de células	52
8. Ensayos de viabilidad celular	53
9. Ensayos de migración celular	53
10. Citometría de flujo	54
11. Anticuerpos	55
12. Extracción de proteínas	56
13. Western blot	56
14. Inmunofluorescencia	57

15. Análisis estadístico-----	58
Resultados-----	60
1. Analisis de polimorfismos relacionados con la autofagia en pacientes diagnosticados con CCR-----	61
2. Efecto de la exposición a condiciones hipóxicas en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales-----	64
2.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia-----	64
2.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en condiciones de hipoxia-----	69
3. Efecto de la exposición a mimetizadores de hipoxia en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales-----	75
3.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia en presencia de DFO-----	75
3.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en presencia de DFO-----	84
4. Nuevas aproximaciones terapéuticas basadas en la autofagia en líneas celulares derivadas de tumores colorrectales expuestas a mimetizadores de hipoxia-----	91
4.1 Caracterización del efecto del fármaco metformina en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO---	91
4.1.2 Evaluación de la respuesta a hipoxia en líneas tumorales de CCR tratadas con metformina y DFO-----	94
4.1.3 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO y metformina-----	96
4.2 Caracterización del efecto del fármaco decitabina® en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO-	100
4.2.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia en líneas tumorales de CCR tratadas con decitabina® y DFO-----	102
4.2.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO y Decitabina®-----	104
4.3 Caracterización del efecto del fármaco cloroquina en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO----	108
4.3.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia en líneas tumorales de CCR tratadas con cloroquina y DFO-----	110
4.3.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO y Decitabina®-----	112
4.4 Caracterización del efecto del fármaco panobinostat® (Ibh589) en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO-	117
4.4.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia en líneas tumorales de CCR tratadas con Panobinostat® (LBH589) y DFO-----	119
4.4.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en líneas tumorales derivadas de CCR expuestas a DFO en tratamiento con Panobinostat®-----	122
4.5 Caracterización del efecto del fármaco paclitaxel en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO-----	126
4.5.1 Evaluación de la respuesta a hipoxia en líneas tumorales de CCR tratadas con paclitaxel y DFO-----	127
4.5.2 Expresión de proteínas implicadas en la autofagia en líneas tumorales derivadas de CCR expuestas a DFO en tratamiento con paclitaxel-----	132
Discusión-----	135
Conclusión-----	155
Bibliografía-----	157

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2015 -----	13
Figura 2. Estructura del intestino grueso -----	14
Figura 3. Distribución de CCR Esporádico, Familiar y Hereditario -----	18
Figura 4. Mecanismo del sistema de reparación de desapareamientos ( <i>Mismatch Repair</i> ) -----	19
Figura 5. Colectomía de un paciente con PAF, que muestra innumerables adenomas tubulares -----	20
Figura 6. APC, relevancia en la vía de señalización celular de Wnt y diagrama de las regiones del gen y relación genotipo-fenotipo de sus mutaciones -----	22
Figura 7. Iniciación y progresión del CCR a partir del epitelio normal, pasando por la lesión precursora y desembocando en la formación de un tumor metastático -----	25
Figura 8. Vías de señalización que promueven la tolerancia a la hipoxia. -----	28
Figura 9. Representación esquemática de las subunidades del factor inducible por hipoxia (HIF). -----	29
Figura 10. Mecanismo celular de respuesta a hipoxia. -----	30
Figura 11. Inhibición del complejo mTOR mediante hipoxia. (Adaptado de (61)). -----	32
Figura 12. Diferentes modalidades de autofagia. -----	33
Figura 13. Complejo ULK1. -----	35
Figura 14. Activación del complejo PI3K de clase III. -----	36
Figura 15. Sistemas de conjugación responsables de la expansión de la membrana. -----	37
Figura 16. Representación gráfica de los dominios de la proteína p62 y su implicación en la eiminación de proteínas ubiquitinizadas mediante el proceso de autofagia. -----	39
Figura 17. Representación gráfica del mecanismo de acción del ensayo de discriminación alélica por sondas TaqMan™ (130). -----	48
Figura 18. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan™ del polimorfismo del gen ATG5 Rs2245214. -----	49
Figura 19. Ensayo de cierre de herida o <i>scratch</i> . -----	54
Figura 20. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP. -----	66
Figura 21. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP. -----	67
Figura 22. Células tumorales derivadas de CCR bajo condiciones de hipoxia (1% de oxígeno) -----	68
Figura 23. Proliferación celular de líneas tumorales expuestas a hipoxia. -----	69
Figura 24. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3.. -----	70
Figura 25. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3.. -----	71
Figura 26. Expresión de la proteína mTOR. -----	72
Figura 27. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5. -----	73
Figura 28. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5. -----	74
Figura 29. Expresión de la proteína HIF1- $\alpha$ en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO -----	75
Figura 30. Expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ y la proteína PARP en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO. -----	76
Figura 31. El DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR -----	77
Figura 32. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP -----	78
Figura 33. El DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR -----	79
Figura 34. El DFO cambia la morfología de las células tumorales derivadas de CCR -----	80



Figura 35. El DFO incrementa la migración de las líneas celulares derivadas de CCR-----	81
Figura 36. Cuantificación de la migración celular. -----	82
Figura 37. El DFO disminuye la proliferación celular de las líneas tumorales derivadas de CCR-----	83
Figura 38. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO. -----	84
Figura 39. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO. -----	85
Figura 40. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO. -----	86
Figura 41. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO-----	87
Figura 42. El DFO incrementa la expresión de LC3B y disminuye la expresión de p62 en líneas celulares de CCR----	88
Figura 43. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO-----	90
Figura 44. El DFO incrementa la expresión de LC3B y disminuye la expresión de p62 en líneas celulares de CCR. ---	91
Figura 45. El tratamiento combinado de metformina y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR -----	93
Figura 46. El tratamiento conjunto metformina-DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR.-----	94
Figura 47. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP -----	95
Figura 48. El tratamiento metformina-DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR-----	96
Figura 49. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y metformina. 97	
Figura 50. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y metformina. -----	98
Figura 51. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y metformina. -----	99
Figura 52. El tratamiento conjunto de metformina y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR-----	100
Figura 53. El tratamiento combinado de Decitabina® y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. -----	101
Figura 54. El tratamiento conjunto Decitabina®-DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR. -----	102
Figura 55. El tratamiento Decitabina®-DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR-----	103
Figura 56. Expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3 y mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y Decitabina®-----	105
Figura 57. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y Decitabina®. -----	106
Figura 58. El tratamiento conjunto de Decitabina® y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR. -----	108
Figura 59. El tratamiento combinado de cloroquina y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. -----	109
Figura 60. El tratamiento conjunto cloroquina y DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR. -----	110
Figura 61. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP. -----	111
Figura 62. El tratamiento cloroquina y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR. -----	112
Figura 63. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y cloroquina. 113	
Figura 64. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y cloroquina. -----	114

Figura 65. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y cloroquina. -----	115
Figura 66. El tratamiento conjunto de cloroquina y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR. -----	116
Figura 67. El tratamiento combinado de LBH589 y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. -----	117
Figura 68. Células tumorales derivadas de CCR tratadas con los fármacos LBH589 y DFO -----	118
Figura 69. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP -----	120
Figura 70. El tratamiento LBH589 y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR -----	121
Figura 71. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y LBH589. --	121
Figura 72. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y LBH589 -----	123
Figura 73. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y LBH589 -----	124
Figura 74. El tratamiento conjunto de LBH589 y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR. -----	125
Figura 75. El tratamiento combinado de paclitaxel y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR -----	126
Figura 76. Células tumorales derivadas de CCR tratadas con los fármacos paclitaxel y DFO -----	127
Figura 77. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ y PARP -----	128
Figura 78. El tratamiento paclitaxel y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$ en líneas celulares de CCR -----	129
Figura 79. El tratamiento combinado de paclitaxel y DFO afecta el ciclo celular de las líneas tumorales derivadas de CCR -----	130
Figura 80. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y paclitaxel--	131
Figura 81. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y paclitaxel -----	132
Figura 82. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y paclitaxel -----	133
Figura 83. El tratamiento conjunto de paclitaxel y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR). -----	134

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación histológica del CCR utilizada por la OMS (13).-----	15
Tabla 2. Clasificación TNM para el CCR (14).-----	16
Tabla 3. Síndromes que predisponen al desarrollo de CCR (24).-----	23
Tabla 4. Proteínas implicadas en la autofagia en mamíferos, sus homólogos en levaduras y sus funciones-----	34
Tabla 5. Moléculas fluorescentes utilizadas con sondas TaqMan™-----	48
Tabla 6. SNPs estudiados en este trabajo de genes relacionados con la autofagia.-----	49
Tabla 7. Ensayos de MTT realizados.-----	50
Tabla 8. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot e inmunofluorescencia (IF)-----	53
Tabla 9. Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia.-----	55
Tabla 10. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con PAF y su asociación con el riesgo a padecer CCR.-----	62
Tabla 11. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con SL y su asociación con el riesgo a padecer CCR.-----	63
Tabla 12. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con CCR esporádico y su asociación con el riesgo a padecer CCR.-----	64



# INTRODUCCIÓN

El término cáncer engloba un conjunto de enfermedades que se caracterizan por el desarrollo de células anormales que se dividen, crecen y pueden tener capacidad de diseminarse sin control en cualquier parte del cuerpo. La mayoría de las neoplasias adquieren el nombre del órgano o tejido donde se originan, y se producen como consecuencia de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas progresivas (1).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) indica que cerca de 14 millones de personas en el mundo padecen cáncer (2). Es la principal causa de mortalidad en países desarrollados y una de las más importantes en aquellos que están en vías de desarrollo. Debido a que esta enfermedad es cada vez más recurrente en la población, representa un importante problema de salud pública a nivel mundial (3).

En el año 2012 se produjeron 8,2 millones de muertes en el mundo a causa de esta enfermedad. Esta patología representa el 26% de mortalidad en los países que constituyen la Unión Europea (UE) (4). Uno de los tipos de cáncer más común es el de pulmón, tanto en términos de incidencia (1,8 millones, 12,9 % en total) como en mortalidad (1,6 millones, 19,4%). Posterior a éste se encuentra el cáncer de mama con 1,7 millones de casos, representado el 11,9% del total de casos mundiales y, en tercer lugar, el cáncer colorrectal (CCR) con 1,4 millones de nuevos casos diagnosticados al año y 694.000 muertes (5).

Los datos publicados por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) indican que la incidencia de esta enfermedad en España en 2015 fue de 247.771 individuos (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Los tipos tumorales más frecuentes diagnosticados en el año 2015 fueron el CCR, próstata, pulmón, mama y vejiga (figura 1) (6).



Figura 1. Incidencia estimada de los tumores más frecuentes en España en el año 2015 (6).

El CCR es el tercer tipo de cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial. Aproximadamente el 55% de los casos ocurren en las regiones desarrolladas. En Europa, el CCR representa el segundo lugar en cuanto a incidencia. Se estima que se diagnostican 447.136 nuevos casos al año, representando el 13% de todos los tipos casos de cáncer (3).

La tasa de mortalidad del CCR a nivel mundial se sitúa en el cuarto puesto y representa el 8.5% de las muertes por cáncer. En las últimas décadas, se ha observado una disminución en la mortalidad en ambos sexos. Los países en los cuales se ha observado esta disminución son: Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y la mayoría de Europa Occidental, incluyendo Austria, Francia, Irlanda y el Reino Unido (7). Además, se ha visto que existe peor prognosis y mayor cantidad de muertes en los países menos desarrollados (5).

En España, el CCR fue uno de los tipos de cáncer más diagnosticados en el año 2015, con aproximadamente 41.441 casos. Por otra parte, según el Instituto Nacional de Epidemiología, entre los años 2003-2012 la mortalidad por estos tumores se redujo un 1.32% al año (0.56% tanto en hombres como en mujeres respectivamente). Estas tendencias, reflejan mejoras en la supervivencia de los pacientes con tumores debido a las actividades preventivas, las campañas de diagnóstico precoz y a los avances terapéuticos (6).

## 1. CÁNCER COLORRECTAL

El colon es una región del intestino grueso, comprendido entre la válvula ileocecal y el ano (figura 2). Su función principal es absorber agua, nutrientes y otras sustancias como electrolitos, minerales y vitaminas de los alimentos. Se divide en ciego, colon ascendente, colon transverso, colon descendente, sigma y recto. El colon presenta altos niveles de regeneración celular y se encuentra expuesto a diversos agentes fisiológicos, biológicos y químicos que incrementan el riesgo a desarrollar diversas enfermedades, incluyendo el cáncer (8).

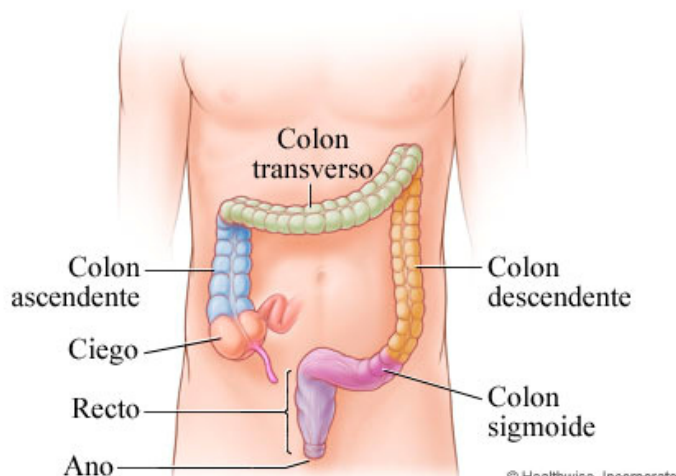


Figura 2. Estructura del intestino grueso (9).

El desarrollo del CCR puede tardar entre 8 y 12 años. Subsecuentemente se puede dispersar hacia los vasos linfáticos, incrementando la posibilidad de metástasis en otras partes del organismo

(10). Más del 95% de los carcinomas colorrectales son adenocarcinomas (ADC). Otros tumores epiteliales (carcinomas) incluyen los carcinomas adenoescamosos, los carcinomas escamosos y los indiferenciados. Otras neoplasias colorrectales son: sarcomas, linfomas, tumores neuroendocrinos o melanoma de la unión anorrectal (10) (tabla 1).

La clasificación patológica del CCR determina hasta dónde se ha extendido la enfermedad en el organismo. En la actualidad, el sistema TNM (*tumor node metastasis*) es el método de estadiaje de neoplasias establecido por el AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) y la Unión Internacional contra el Cáncer más utilizado por el cual se clasifican los tumores. En este sistema las T aportan información sobre el grado de extensión tumoral, las N la propagación a ganglios linfáticos regionales y las M la presencia o ausencia de metástasis a distancia (11) (tabla 2).

La clasificación de los tumores colorrectales es de gran importancia tanto para el diagnóstico como para el tratamiento ya que se ha observado que muestran cambios en la supervivencia y distintas respuestas a fármacos quimioterapéuticos según los diferentes subtipos de CCR (12).

**Tabla 1. Clasificación histológica del CCR utilizada por la OMS (13).**

Tumores epiteliales	Tumores no epiteliales
Adenocarcinomas (ADC)	Sarcomas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubular o glanular</li> <li>• Mucinoso</li> <li>• Células anillo de sello medular</li> </ul>	Linfomas
Carcinoma escamoso	Tumores neuroendocrinos
Carcinoma adenoescamoso	Melanomas
Carcinoma indiferenciado	Otros
Carcinoma no clasificable	

Tabla 2. Clasificación TNM para el CCR (14).

<b>T: Tumor primario</b>	
Tx	El tumor primario no puede determinarse.
T0	No hay evidencias de tumor primario.
Tis	Carcinoma " <i>in situ</i> ": intraepitelial o invasión de la lámina propia.
T1	El tumor invade la submucosa.
T2	Tumor invade la capa muscular propia.
T3	El tumor invade la subserosa o tejidos pericorrectales.
T4	El tumor invade otros órganos o estructuras.
<b>N: Invasión de ganglios linfáticos</b>	
Nx	No se puede valorar el número de ganglios afectados.
N0	No hay ganglios linfáticos regionales afectados.
N1	Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.
N2	Metástasis en más de 4 ganglios linfáticos regionales.
<b>M: Metástasis a distancia</b>	
Mx	No se puede comprobar la existencia de metástasis a distancia.
M0	No hay metástasis a distancia.
M1	Metástasis a distancia presente.

## 1.2 ETIOLOGÍA DEL CCR

En la etiología del CCR se ven implicados diferentes factores, como es la edad, factores ambientales y genéticos.

### 1.2.1 Edad

Este factor es uno de los más influyentes. Datos recientes sugieren que el 90% de los individuos diagnosticados presentan edades mayores de 50 años. Diferentes organizaciones involucradas en la prevención contra el CCR han establecido que los adultos con 50 años o más deben comenzar a realizar revisiones, preferiblemente por métodos que permitan la detección de adenomas mucho antes de desarrollar este tipo de cáncer (15).

### 1.2.2. Factores Ambientales

Los factores ambientales tienen gran importancia en la aparición y el desarrollo del CCR; entre ellos el estilo de vida, la alimentación, el consumo de alcohol y el tabaco.



### **a) Estilo de vida**

La obesidad es una enfermedad que continua en crecimiento y se impone como uno de los problemas globales de salud. Se ha demostrado que es un factor de riesgo para varias enfermedades, incluyendo algunos tipos de cáncer como el CCR (16).

Los posibles mecanismos biológicos que vinculan la obesidad con el CCR incluyen alta ingesta calórica, inactividad física, resistencia a la insulina, hiperinsulinemia, hipersecreción de adipocinas, inflamación crónica y estrés oxidativo. La obesidad ha sido constantemente asociada con un aumento de riesgo a desarrollar adenomas y, en consecuencia, a padecer CCR. Sin embargo, los estudios que evalúan la obesidad en relación con la formación de adenomas son inconsistentes o limitados (16).

### **b) Dieta**

Distintos estudios han tratado de demostrar que el consumo de algunos nutrientes puede influenciar el desarrollo de CCR. La ingesta de carne en particular, tanto procesada como carne roja, ha sido implicada en múltiples estudios (17). Diferentes trabajos han sugerido que cocinar carne, especialmente a altas temperaturas o en contacto directo con el fuego produce componentes carcinógenos. El trabajo realizado por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer ha evaluado que el consumo de carne roja y carne procesada aumenta el riesgo a padecer CCR (18).

Por otra parte, el consumo de frutas, verduras y fibras también ha sido correlacionado negativamente con la incidencia de CCR. Distintos estudios han observado que la mayor ingesta de fibra puede disminuir hasta un 44% el riesgo de desarrollar CCR en comparación con una menor ingesta de fibra (19). Además, se ha demostrado que la fibra vegetal contiene diversos componentes como las vitaminas, antioxidantes, ácido fólico, selenio y flavonas que también ejercen un efecto protector frente al desarrollo de esta enfermedad (15).

### **c) Tabaco**

El consumo de tabaco se ha asociado con un gran número de enfermedades. Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado que pacientes que consumían treinta o más cigarrillos por día presentaban el doble de riesgo de desarrollar pólipos. Además, la presencia de productos carcinógenos en el tabaco incrementan el riesgo de padecer CCR (17). Evidencias experimentales sugieren que el consumo de tabaco puede generar alteraciones epigenéticas a través de la hipermetilación de las islas CpG (20).

### **d) Alcohol**

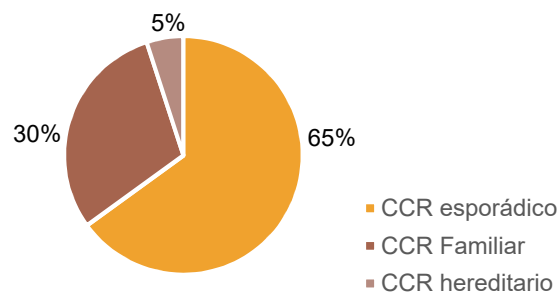
El consumo de alcohol se ha asociado con varias enfermedades, incluyendo ciertos tipos de cáncer como el CCR. Un metanálisis publicado en el 2015 que incluye veintisiete estudios caso-control y tres estudios de cohortes concluye que, comparado con no bebedores, la ingesta de alcohol se asocia a un incremento de CCR (21). Los mecanismos moleculares por los cuales el consumo de alcohol puede conllevar al desarrollo de CCR no están establecidos. Sin embargo, se ha demostrado que el

metabolito del alcohol, el acetaldehído podría inducir hipometilación del DNA, además, puede alterar la integridad del mismo conllevando a la expresión de diferentes oncogenes (19, 20).

### 1.2.3 Factores genéticos

La mayoría de los casos de CCR se originan a partir de mutaciones somáticas esporádicas, pero diversas investigaciones han estimado que el 30% de todos los casos tiene antecedentes (figura 3).

Una de las características principales de los casos familiares es la ausencia de mutaciones en genes de alta penetrancia (23). Dentro de los casos de CCR familiares existe un subconjunto de casos denominados CCR hereditario, los cuales representa menos del 5% de todos los casos y se caracterizan por presentar mutaciones en la línea germinal (figura 3) (24).



**Figura 3. Distribución de CCR Esporádico, Familiar y Hereditario. (Adaptada de (23)).**

El CCR hereditario ocurre a una edad más temprana que en las formas esporádicas, lo que es debido a que las mutaciones germinales tienen alta penetrancia, por lo que sólo se necesita un evento mutacional somático adicional para desarrollar la enfermedad (25).

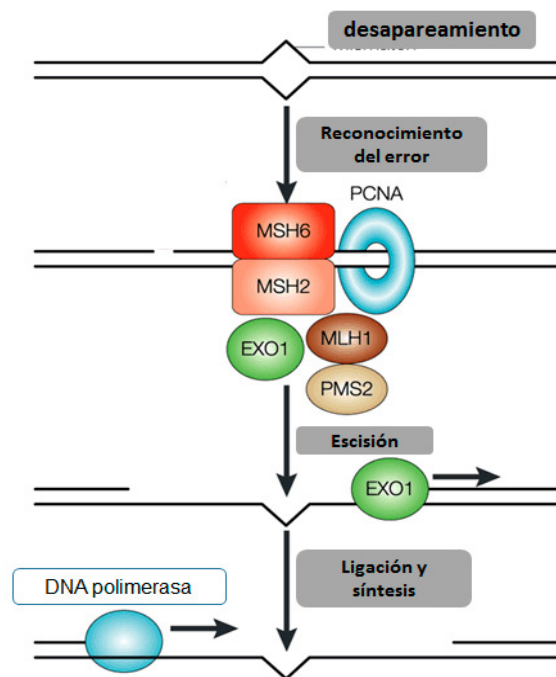
Existen diferentes síndromes hereditarios que predisponen a CCR, dependiendo del tipo de lesión precursora y del gen afectado. Se han descubierto nuevos síndromes causados por distintos genes como *GREM1*, *BUB1*, *BUB3*, *POLE*, *POLD1*, *RPS20*, *SEMA4A*, *NTHL1*, *FAN1* y *BLM* que predisponen a padecer CCR hereditario (26–28). Estos genes aún no están incluidos en el programa de diagnóstico molecular debido a su relativa novedad, la falta de una clara caracterización del fenotipo clínico y su baja frecuencia (28).

#### 1.2.3.1 Síndromes hereditarios de predisposición al CCR

##### a) Síndrome no polipósico

El síndrome no polipósico de predisposición al CCR o también denominado Síndrome de Lynch (SL) es el más frecuente de todos los casos de CCR hereditarios que se diagnostican en la actualidad. Sigue un patrón de herencia mendeliano autosómico dominante y confiere un riesgo aumentado de padecer otros tipo de tumores extracolónicos como endometrio, mama y sistema nervioso central (29).

Este síndrome surge en edades más tempranas, con una media de edad al diagnóstico de 43 años. Los individuos con SL presentan un riesgo del 60-80% de desarrollar CCR a lo largo de su vida y los tumores asociados se localizan habitualmente en el colon proximal. Se caracteriza por la presencia de mutaciones germinales en genes involucrados en el sistema de reparación de errores por desapareamiento del DNA (*DNA Mismatch Repair* o MMR) (*MSH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* y *PMS2*) o en el extremo 3' UTR del gen *EPCAM* (figura 4). Estas alteraciones provocan un aumento en la frecuencia de mutaciones, conllevando a la inestabilidad del genoma. Esto puede afectar regiones codificantes de genes relacionados con la progresión tumoral (*TGF-BRII*, *IGFIIR*, *MSH3* y *BAX*) como zonas altamente repetitivas, denominadas microsatélites. Cuando aparecen mutaciones en estas regiones se produce el fenómeno conocido como inestabilidad de microsatélites (IMS) (30).



**Figura 4. Mecanismo del sistema de reparación de desapareamientos (*Mismatch Repair*). (Adaptada de (31)).** Este mecanismo consiste en el reconocimiento por el complejo *MSH2-MSH6* de desempareamientos de base simple o por el complejo *MSH2-MSH3* (llamado MutS) que participa en la corrección de los bucles de inserción o deleción producidas durante la replicación. Posteriormente el heterodímero formado por *MLH1* y *PMS2* se une con MutSa o MutSb formando un complejo y, junto con otras proteínas, realiza la escisión del fragmento donde se encuentra el error, la síntesis del nuevo fragmento a partir de la cadena de DNA sin error y unión del nuevo fragmento de DNA (32).

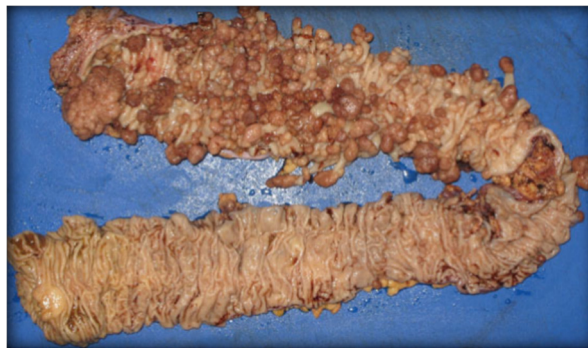
El diagnóstico de esta enfermedad se basa en criterios de agregación familiar conocidos como los criterios de Ámsterdam (33), los cuales fueron sometidos a posteriores revisiones para incluir los cánceres extracolónicos dentro del concepto de la agregación familiar. La sensibilidad de estos criterios para detectar pacientes portadores de mutaciones en los genes relacionados con el SL es inferior al 60%. Como consecuencia, los criterios de Bethesda fueron creados para identificar los afectados de CCR

que no cumplieran los criterios de Ámsterdam, pero que debían ser igualmente sometidos al diagnóstico molecular. Si estos criterios se cumplen, se procede a realizar el diagnóstico molecular (34).

### b) Poliposis

Las poliposis gastrointestinales se caracterizan por la presencia de múltiples lesiones polipoideas con afectación preferente del área colorrectal. Constituyen un grupo de patologías de escasa incidencia, pero con diferentes características (35).

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) es el síndrome polipósico más común y está caracterizado por el desarrollo de cientos a miles de pólipos en el colon y el recto (figura 5). Tiene una prevalencia de 1 cada 10.000 individuos y una incidencia en la población española de 2,8 por cada 100.000 habitantes (35). En la mayoría de los pacientes los pólipos empiezan a desarrollarse durante la segunda década de la vida y, en todos los casos, los pacientes sin tratamiento desarrollan tumores entre los 40 y los 50 años (36). El patrón de herencia para la PAF es autosómico dominante, por lo que en las familias portadoras de una mutación asociada a este síndrome existe una fuerte agregación, aunque aproximadamente un 25% de los casos son causados por mutaciones de *novo* (35).



**Figura 5. Colectomía de un paciente con PAF, que muestra innumerables adenomas tubulares (35).**

La PAF se asocia a mutaciones germinales en el gen *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), las cuales tienen una penetrancia del 100%. Este gen se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5. Interviene en la vía de señalización celular de Wnt y en la adhesión celular (36), activando la proliferación responsable de la renovación constante de las células del colon (figura 6). Hasta la fecha se han identificado más de 1.500 mutaciones germinales en familias con CCR y la mayoría son mutaciones que generan la inactivación de la proteína, bien sea por mutaciones de cambio en la fase de lectura, mutaciones que generan un codón de parada o alteraciones en los sitios de procesamiento del RNA. Otras mutaciones que también se han observado son aquellas que generan un cambio de aminoácido en la proteína. La mayoría de estas mutaciones han sido encontradas en el exón 15 de este gen (32).

La inactivación bialélica del gen *APC* debido a una mutación somática en el otro alelo, genera la activación de la proliferación celular descontrolada. Esto provocará la formación de adenomas, que

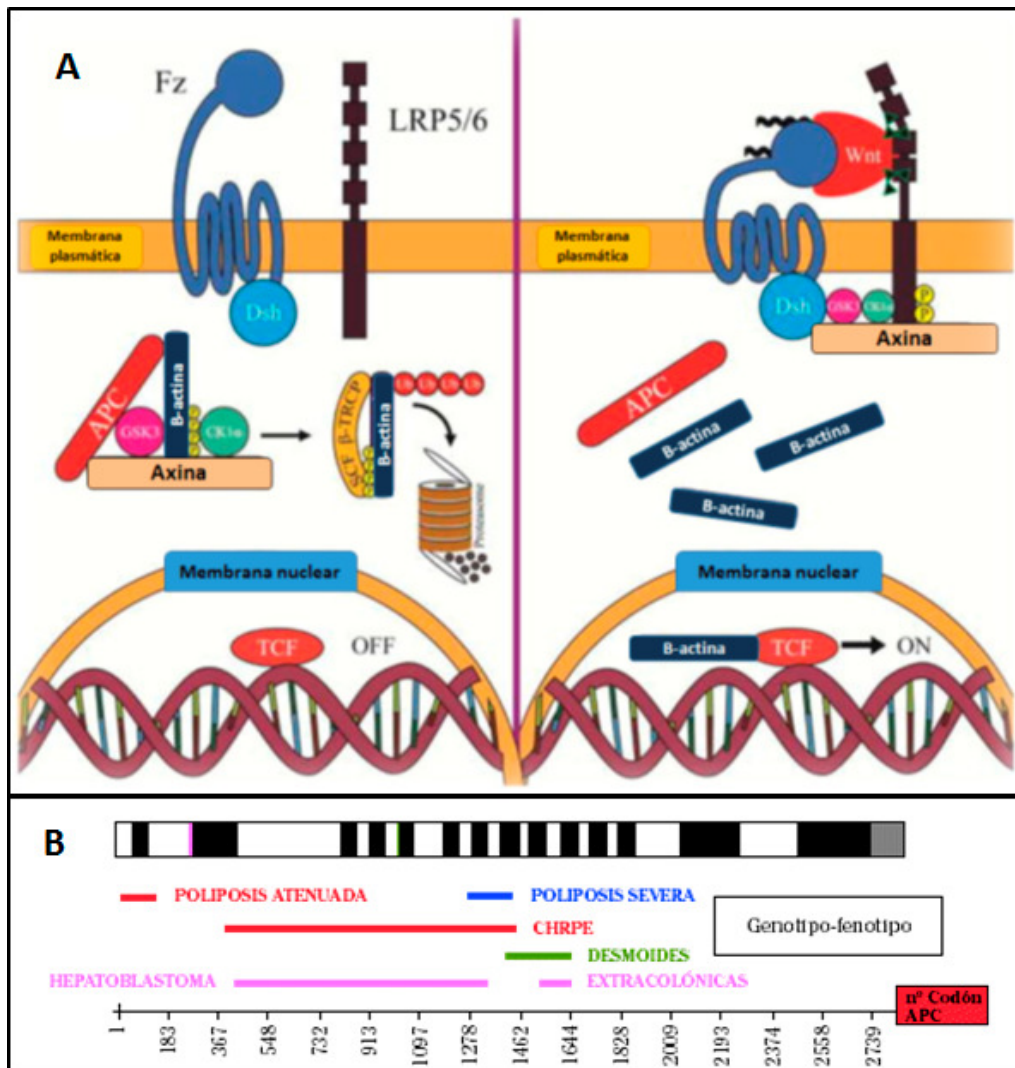
progresarán hacia CCR a medida que se acumulen otras mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores (37).

Los individuos con PAF también tienen predisposición a desarrollar una serie de manifestaciones que incluyen fibromas, lipomas, quistes sebáceos y epidérmicos, osteomas faciales, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina (CHRPE) y tumores desmoides (figura 6) (37).

Existe una variante atenuada de la PAF, denominada Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA), la cual se caracteriza por presentar menor número de pólipos, generalmente más de 15 y menos de 100, y tiende a desarrollarse en el colon derecho. La edad de aparición de los individuos afectados por la PAFA suele retrasarse 15 años con respecto a la PAF clásica. Además, presenta limitadas manifestaciones extracolónicas. El 10% de las familias con este síndrome presentan mutaciones germinales en el gen *APC*, situadas la mayor parte en el extremo 3' (figura 6), otras alteraciones asociadas a esta patología se han observado en las regiones del extremo 5', y en el exón 9 de dicho gen (38).

El 30% de las familias afectadas con PAFA no presentan mutaciones en el gen *APC*, pero presentan mutaciones en el gen *MYH*; en estos casos, el síndrome se denomina Poliposis Adenomatosa asociada al gen *MYH* (PAM) y presenta un patrón de herencia autosómico recesivo (36, 39).

Además de los síndromes mencionados anteriormente, en la tabla 3 se incluyen diferentes tipos de poliposis gastrointestinales asociados al riesgo de padecer CCR, dentro de los cuales se incluye el síndrome de Peutz-Jeghers, la Poliposis Familiar Juvenil y Poliposis Hiperplásica, el síndrome de Codwen y Poliposis asociada a los genes que codifican la DNA polimerasa.



**Figura 6. APC, relevancia en la vía de señalización celular de Wnt y diagrama de las regiones del gen y relación genotipo–fenotipo de sus mutaciones. (Adaptada de (39, 40)).** A) La proteína APC posee una función de supresión tumoral en el colon humano. Esta proteína se une a la proteína  $\beta$ -catenina y Axina en un complejo que activa la fosforilación mediada por GSK3 $\beta$ . De esta manera  $\beta$ -catenina queda marcada para una posterior proteólisis mediada por ubiquitina. Cuando ocurre mutaciones en el gen APC que afectan la función de la proteína no ocurre la degradación de  $\beta$ -catenina. Esta proteína se acumula en el citoplasma, formando un complejo con el factor de transcripción LEF-1 o TCF, penetra en el núcleo y activa la transcripción de oncogenes. B) Esquema del gen APC donde se incluyen las regiones más estudiadas, se distribuyen en las 3 repeticiones de 15 aminoácidos (entre los codones 1.020 y 1.169) y las 7 repeticiones de 20 aminoácidos (entre los codones 1.262 y 2.033), que controlan y permiten la unión a la proteína  $\beta$ -catenina. El extremo C-terminal del gen APC también contiene un sitio de unión para la proteína EB1, la cual está asociada con el centrómero, el huso mitótico, la polaridad de los microtúbulos y la estabilidad cromosómica en todos los estadios del ciclo celular.

Tabla 3. Síndromes que predisponen al desarrollo de CCR (24).

Condición	Tipo	Herencia	Gen	Identificación
<b>No polipósico</b>	Lynch (SL)	Autosómico dominante	<i>MLH1, PMS1, PMS2, MSH2, MSH3, MSH6</i>	Individuos con historia familiar (según los criterios de Ámsterdam). mutaciones en los genes de reparación del DNA.
<b>Poliposis: pólipos adenomatosos</b>	PAF	Autosómico dominante	<i>APC</i>	Individuos con >10 pólipos, familiares de primer grado con PAF/PAF atenuada, presencia de adenomas con rasgos de PAF.
<b>Poliposis: pólipos adenomatosos</b>	PAFA	Autosómico dominante	<i>APC</i>	Individuos con >10 pólipos, familiares de primer grado con PAF/PAF atenuada, presencia de adenomas con rasgos de PAF.
<b>Poliposis: pólipos adenomatosos</b>	PAM	Autosómico recesivo	<i>MUTYH</i>	Individuos con >10 pólipos, presencia de adenomas y tumores extracolónicos asociados a PAM
<b>Poliposis: pólipos adenomatosos</b>	PPAP	Autosómico dominante	<i>POLE, POLD1</i>	Individuos con >10 pólipos, presencia de adenomas con rasgos de PAF pero no tienen mutaciones germinales en el gen APC o un patrón de herencia dominante
<b>Poliposis: pólipos hamartomatosos</b>	PJS	Autosómico dominante	<i>LKB1 (STK11)</i>	Individuos con inicio temprano de lesiones pigmentadas, pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal consistente con esta patología y familiares de primer grado con síndrome de Peutz-Jeghers.
<b>Poliposis: pólipos hamartomatosos</b>	SPJ	Autosómico dominante	<i>SMAD4, BMPR1A</i>	Individuos juveniles con >10 pólipos, pacientes con pólipos juveniles y con familiares de primer grado que presentan esta patología.
<b>Poliposis: pólipos hamartomatosos</b>	SC	Autosómico dominante	<i>PTEN</i>	Individuos con familiares de primer grado con SC o individuos con variedad de pólipos colónicos y manifestaciones extracolónicas.
<b>Poliposis: pólipos hiperplásicos</b>	PHP	Desconocido	Desconocido	Individuos con esta patología se encuentran en muy baja frecuencia

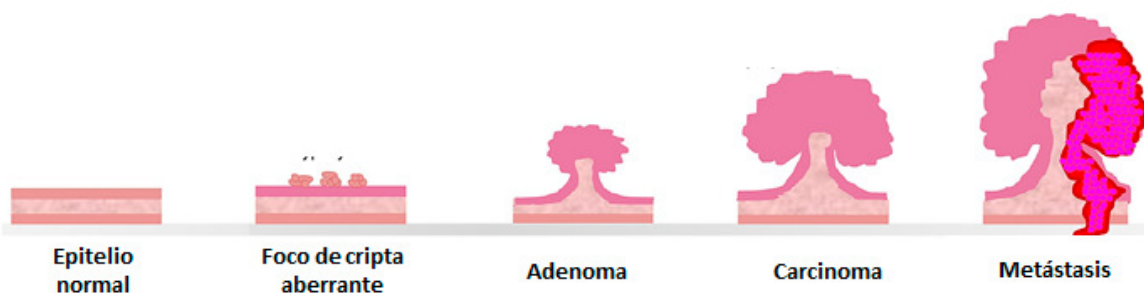
Abreviaciones: PAFA, poliposis adenomatosa atenuada; SC, síndrome de Cowden; PAF, poliposis adenomatosa familiar; PHP, poliposis hiperplásica; SPJ, síndrome de poliposis juvenil; PAM, poliposis asociada a MUTYH; PJS, síndrome de Peutz-Jeghers; PPAP, poliposis asociada a mutaciones en los genes que codifican para ADN polimerasa.

## 2. CÁNCER COLORRECTAL Y CARCINOGENÉISIS

El CCR surge a partir de lesiones precursoras, y su detección y resección temprana es vital para la prevención del cáncer (42). Antes del desarrollo de la lesión ocurren alteraciones genéticas secuenciales que conllevan a la generación de la llamada cripta de foco aberrante (figura 7), que es una acumulación de células epiteliales resistentes a la apoptosis, la cual da lugar a la formación de adenomas microscópicos. Posteriormente ocurre una lesión mayor que se clasifica en pólipos, bien sean adenomatosos o serrados (43).

Los pólipos adenomatosos tienen una organización intracelular e intercelular anormal definida como displasia. Existen adenomas con ciertas características que aumentan el riesgo de progresión a CCR de forma independiente, la existencia de componente vellosos (morfología en forma de crisantemo o de coliflor) o un alto grado de displasia. Por otro lado, los pólipos serrados son un grupo heterogéneo caracterizado por una arquitectura epitelial con forma de dientes de sierra o estrellada y están subdivididos en pólipos hiperplásicos, pólipos mixtos, adenomas serrados tradicionales y adenomas serrados sésiles. Recientemente se ha descubierto que los pólipos serrados también pueden progresar a CCR (a excepción de los hiperplásicos de menos de 5 mm) y, por tanto, también deben ser extraídos del colon (42, 43).

Posteriormente, estas lesiones avanzadas crecen y generan el carcinoma, progresando de forma circular hacia la pared de colon. Tras esto ocurre la diseminación ganglionar y, por último, la metástasis (43). En esta etapa las células cancerígenas pierden la habilidad de adherirse a la masa tumoral y desarrollan capacidades tanto migratorias como invasivas. Se diferencian por cambios en la función y expresión genética, destacándose la disminución de marcadores epiteliales y el aumento de marcadores mesenquimales así como la evasión de la acción del sistema inmune, para posteriormente adherirse a otra localización en el cuerpo (figura 7) (45).



**Figura 7. Iniciación y progresión del CCR a partir del epitelio normal, pasando por la lesión precursora y desembocando en la formación de un tumor metastático (46).**

El CCR esporádico corresponde a la mayoría de los casos diagnosticados y no presenta agregación familiar. Es causado por mutaciones somáticas generadas durante la vida del individuo



debido a la edad o a factores ambientales. Éstas afectan genes cuya alteración favorece la acumulación posterior de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. Existen tres modelos de carcinogénesis por los que se sugiere que se desarrolla el CCR en base a los eventos mutacionales acumulados. Estos permiten diferenciar a los tumores por sus características moleculares (47).

### 2.1. Tumores de inestabilidad cromosómica

El 85% de los casos de CCR se desarrollan a través de la vía de inestabilidad cromosómica (INC) (44, 48) y se caracterizan por frecuentes pérdidas o ganancias de material genético (32). En los CCR con fenotipo INC se observa con frecuencia pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 18 y mutaciones en el gen *KRAS*. Además, se ha observado la activación de pro-oncogenes como *c-MYC* y la inactivación de genes supresores de tumores como *APC*, *TP53*, *SMAD2* y *SMAD6* (49).

El fenotipo INC puede originarse debido a errores en los mecanismos que establecen una correcta segregación cromosómica, como el punto de control del ensamblaje de huso mitótico, la duplicación correcta de los centrosomas durante la mitosis y la longitud de los telómeros (50). Otra causa que conlleva a la generación de INC son las alteraciones en los genes de reparación de daño en el DNA como *TP53* (48).

### 2.2. Tumores con inestabilidad de microsatélites

Existe un 15% de los CCR esporádicos en los cuales no se identifica evidencia de INC, pero exhiben aberraciones que son detectables a nivel molecular. Estas son alteraciones en unidades repetitivas de DNA que se producen normalmente a lo largo del genoma, conocidas como microsatélites. Esto ocurre debido a que existen alteraciones en el sistema de reparación de apareamiento de bases durante la replicación del DNA (44).

De todos los casos con inestabilidad de microsatélites (IMS), el 75-80% pertenecen a la categoría de cáncer de colon esporádico y sólo el 20-25% son tumores asociados al SL. Este modelo se desarrolla principalmente por el mal funcionamiento de sistema MMR que puede afectar a las regiones codificantes de genes relacionados con la progresión tumoral, la apoptosis, la vía de señalización de Wnt, o las secuencias de microsatélites (51). Diferentes investigaciones han publicado que una fracción importante de los casos esporádicos con IMS ocurren debido a la hipermetilación de la región promotora del gen *MLH1* (49, 50).

La característica principal de los CCR con IMS es que presentan estabilidad cromosómica, baja frecuencia de pérdida de heterocigosidad y un menor número de mutaciones en los genes *KRAS* y *TP53* en comparación con los tumores con INC (54).

### 2.3. Tumores con fenotipo metilador de islas CpG

Las islas CpG son secuencias en el DNA que están presentes en aproximadamente el 40% de las regiones promotoras de los genes de los mamíferos y se caracterizan por presentar una gran cantidad de pares de bases de citosinas y guaninas enlazados por fosfatos (55). El modelo metilador se basa en la regulación ejercida por los mecanismos epigenéticos sobre la expresión de los oncogenes, ya que alteraciones en los islotes CpG, como metilaciones pueden modular la expresión de los mismos (8).

El 15% de los CCR esporádicos presenta metilación aberrante en los promotores de un conjunto de genes específicos como *THBS1*, *p16* y *MLH1*, por lo que se han denominado tumores con fenotipo metilador de las islas CpG (53). Debido a la hipermetilación aberrante de *MLH1*, este fenotipo puede solaparse con el de IMS en los tumores. Diferentes investigaciones sugieren que esta vía se desarrolla de forma más rápida que las otras, lo que implica mayor agresividad tumoral y mayor dificultad en la identificación de sus lesiones precursoras (47).

Los tumores originados por esta vía surgen a partir de pólipos serrados y parecen no seguir los mecanismos habituales de la secuencia clásica adenoma-carcinoma (57). Se ha demostrado que los carcinomas con fenotipo metilador suelen presentar IMS, alta tasa de mutaciones en el gen *BRAF* o *KRAS* y baja mutaciones en el gen *TP53* (44, 54).

## 3. METABOLISMO TUMORAL

En las células tumorales ocurren alteraciones genéticas y cambios microambientales que afectan la disponibilidad de nutrientes y oxígeno generando una reprogramación metabólica (58).

La mayoría de las células cancerígenas muestran alteraciones en el metabolismo de la glucosa. Comparadas con las células normales, las células cancerosas muestran un incremento en la captación de glucosa y en la glucólisis. Este incremento en el consumo de glucosa genera una mayor cantidad de metabolitos glucolíticos y aumenta la cantidad de ATP. Una gran parte del carbono proveniente de la glucosa, en la forma de varios intermediarios glucolíticos se introducen en múltiples vías biosintéticas. La mayoría del piruvato generado durante la glucólisis se convierte en lactato en el citoplasma por acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y es secretado en vez de ser oxidado en la mitocondria. Esta reprogramación del metabolismo energético hacia la glucólisis está definida como efecto Warburg (59).

Distintos trabajos han indicado que los tumores obtienen el 50% de su energía a partir de la glucosa, lo que permite la síntesis de macromoléculas. Además, tienen la característica de presentar un ambiente ácido, que resulta de la producción de lactato y otros ácidos, sin embargo, el pH citosólico es similar al de las células normales (58, 59).

El metabolismo celular contribuye de manera importante en la progresión tumoral, en el mantenimiento constante de energía y en la respuesta al tratamiento. Se ha demostrado que los cambios metabólicos en la célula tumoral retroalimentan las principales características determinantes del cáncer: crecimiento aberrante, resistencia a la apoptosis, angiogénesis, evasión de la respuesta inmunitaria, invasión de tejidos y metástasis (61).

### 3.1 HIPOXIA

La hipoxia es la reducción de la tensión de oxígeno, que se define en términos clínicos por la reducción de la disponibilidad de oxígeno hasta niveles críticos; es decir, hasta valores de tensión inferiores al 7% (62).

El crecimiento tumoral genera un microambiente que induce la formación de una nueva estructura vascular para obtener oxígeno y nutrientes (63). El suministro de oxígeno es esencial para el mantenimiento de la función y fisiología de las células. Cuanto más células están presentes en un tejido más oxígeno se requiere, por tanto, la respuesta a hipoxia requiere un alto nivel de coordinación (64).

Para hacer frente a la hipoxia y mantener la demanda energética, las células tumorales desarrollan numerosas respuestas adaptativas. Múltiples mecanismos son activados y generan variaciones en la expresión genética, las cuales inician una serie de vías de señalización sensibles al oxígeno que permiten la supervivencia y la proliferación de las células (65). Dentro de los procesos celulares que se activan se incluye la glicólisis, la angiogénesis y la autofagia (figura 8).

Cuando aumenta el crecimiento del tumor, las células más alejadas de los vasos sanguíneos se encuentran ante una carencia de oxígeno. Estas células segregan factores de crecimiento que hacen que los vasos preexistentes respondan ramificándose y formando nuevos vasos en dirección al foco hipóxico, permitiendo finalmente el aporte sanguíneo necesario en esta zona (66).

Bajo condiciones de hipoxia, una de las principales vías de señalización que promueven la tolerancia a este tipo de estrés es la vía en la que interviene el factor inducible de hipoxia, factor de transcripción conocido como HIF-1. Este factor actúa como regulador de la homeostasis del oxígeno, permitiendo la transcripción de genes que conllevan a la activación de numerosos mecanismos de respuesta frente a este tipo de estrés celular (figura 8) (67).

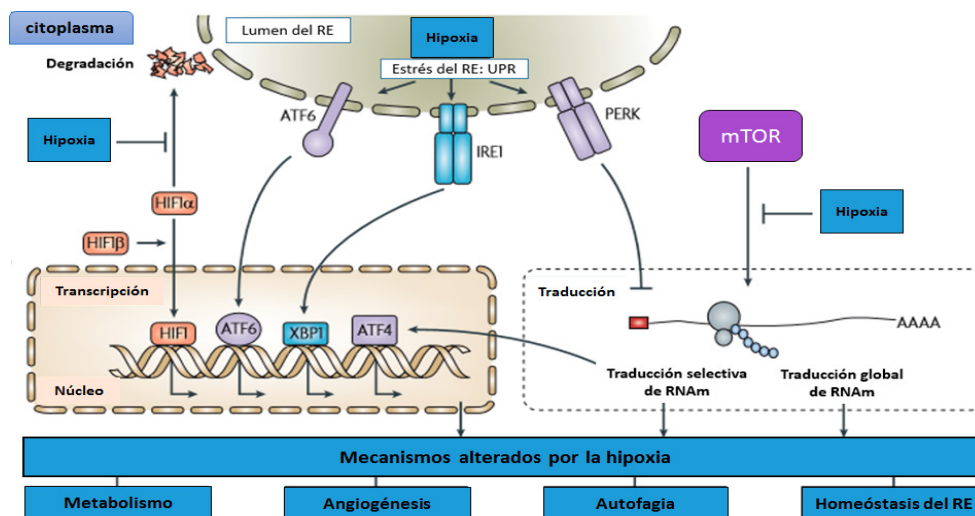
Otras dos vías implicadas en la respuesta a la privación de oxígeno se activan a través de la proteína mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) y a partir de la respuesta a proteínas desplegadas o UPR (*unfolded protein response*). mTOR regula múltiples señales metabólicas, dentro de las cuales se encuentran la iniciación de la síntesis de proteínas, el proceso de autofagia y la sensibilidad a la apoptosis (figura 8). La vía de señalización UPR es una respuesta al estrés celular relacionado con el retículo endoplasmático, que se conserva en todas las especies mamíferas. La respuesta UPR controla otros procesos que incluyen la producción, maduración y degradación de las proteínas, el metabolismo y la muerte celular (figura 8) (63).

### 3.2 PROTEÍNA HIF-1

El factor inducible de hipoxia o HIF-1 es un factor de transcripción que regula la respuesta celular a la hipoxia. Interviene en la activación de las respuestas adaptativas de las células para hacer frente a la poca disponibilidad de oxígeno. Este factor genera la activación transcripcional de más de 100 genes que participan en los procesos biológicos necesarios para la supervivencia y progresión celular (67).

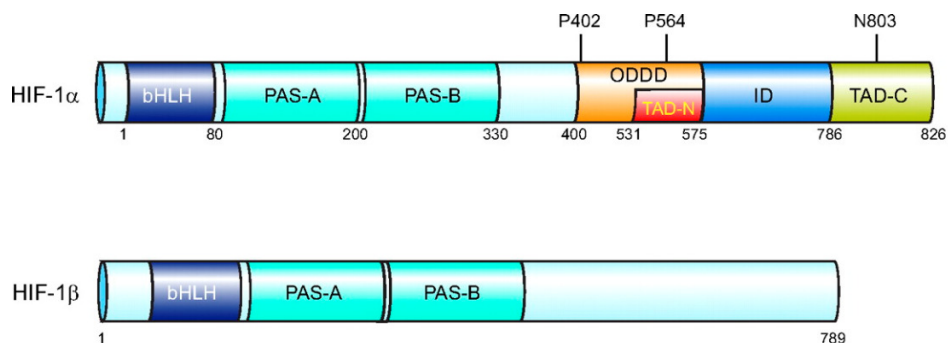
La proteína HIF-1 pertenece a la familia bHLH-PAS (*Basic hélix-loop-helix/Per-ARNT-Sim*) y presenta dominios reconocibles que pueden regular la expresión de diferentes genes (figura 9) (67). Los motivos de bHLH-PAS son esenciales para la formación de heterodímeros y la unión a algunos genes. Estos genes son portadores de la secuencia de DNA denominada HRE o elementos de respuesta a hipoxia, los cuales se ubican en las regiones promotoras y promueven el aumento de su expresión (64).

HIF-1 es un heterodímero que comprende dos subunidades, la subunidad  $\beta$ , es una proteína nuclear estable, con un peso de 91-94 kD, que no depende del oxígeno y se expresa constitutivamente (63); es identificada como un receptor nuclear translocador de aril hidrocarburos o ARNT. Esta proteína dimeriza con receptores de aril hidrocarburos AhR activados (*Aryl Hydrocarbon Receptor*) facilitando la translocación al núcleo (65, 66).



**Figura 8. Vías de señalización que promueven la tolerancia a la hipoxia. (Adaptada de (61)).** Al generarse hipoxia la proteína HIF-1 $\alpha$  heterodimeriza con la proteína HIF-1 $\beta$  lo que conlleva a la transcripción de múltiples genes. Además, ocurre la activación de la respuesta UPR por los sensores de estrés del retículo endoplasmático como son la proteína PERK (PKR-ER quinasa) y la proteína IRE1 (Inositol-requerido para la proteína 1). Estas dos proteínas pueden activar al factor de transcripción ATF6 (factor de transcripción 6) y contribuir a la respuesta transcripcional de genes por su interacción con IRE1 y a la inhibición de la traducción de algunos mRNA al interaccionar con PERK. Otra proteína que es inhibida por la hipoxia es mTOR, que contribuye a la activación de otras vías de señalización durante la exposición a este tipo de estrés que permiten la supervivencia de la célula. Las activaciones de estas rutas metabólicas generan el fenotipo hipóxico, alterando su metabolismo y activando diferentes mecanismos de respuesta como son la angiogénesis, la autofagia, la homeostasis del retículo endoplasmático (Homeostasis RE), entre otras.

Por su parte, la subunidad  $\alpha$  presenta un peso molecular de 120-130 kD, es regulada principalmente por mecanismos que dependen de la disponibilidad de oxígeno y, en condiciones de normoxia, se sintetiza y se degrada constantemente. En sus extremos terminales contiene dominios de trans-activación TAD (*Trans-Activation Domain*) (figura 9). Estos dominios pueden interactuar con ciertos co-activadores como CBP/p300 para modular la transcripción de esta subunidad bajo condiciones de hipoxia, así como también ser responsables de la estabilización de la misma. A diferencia de la subunidad  $\beta$ , presenta un dominio de degradación dependiente de oxígeno, ODDD (*Oxygen Dependent Degradation Domain*), el cual es hidroxilado sobre residuos específicos, lo que permite su degradación a través del proteasoma (figura 9) (67).



**Figura 9. Representación esquemática de las subunidades del factor inducible por hipoxia (HIF) (69).** En la figura se muestran los dominios funcionales y se marcan las localizaciones de los residuos de aminoácidos relevantes para la regulación de HIF-1 $\alpha$ . Se observa representado el dominio bHLH, el dominio de homología Per-Arnt-Sim (PAS), el dominio de degradación dependiente de oxígeno (ODDD), los dominios de transactivación de terminal TAD – N (N - terminal) y el dominio TAD– C (C - terminal).

Se conocen otras isoformas de HIF1- $\alpha$ : HIF-2 $\alpha$  y HIF-3 $\alpha$ . HIF-2 $\alpha$  tiene mayor similitud con HIF-1 $\alpha$  que HIF-3 $\alpha$ . Esta semejanza podría explicar la capacidad de esta isoforma de realizar la heterodimerización con HIF-1 $\beta$ . Curiosamente, HIF-1 $\alpha$  y HIF-2 $\alpha$  muestran diferencias en la distribución de tejido (70). HIF-1 $\alpha$  se expresa de forma ubicua en el cuerpo, pero HIF-2 $\alpha$  es más estricta a los tejidos específicos. HIF-3 $\alpha$  está menos relacionada a las isoformas anteriores y su función no se conoce completamente. Esta isoforma carece de dominios TAD e inhibe la respuesta de HIF-1 ya que forma heterodímeros transcripcionalmente inactivos con HIF-1 $\alpha$  (71).

### 3.3 REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE HIF-1 $\alpha$

El sistema HIF-1 actúa como el máximo regulador de la respuesta a hipoxia, iniciando la cascada de mecanismos que permiten que las células se adapten al microambiente hostil (72).

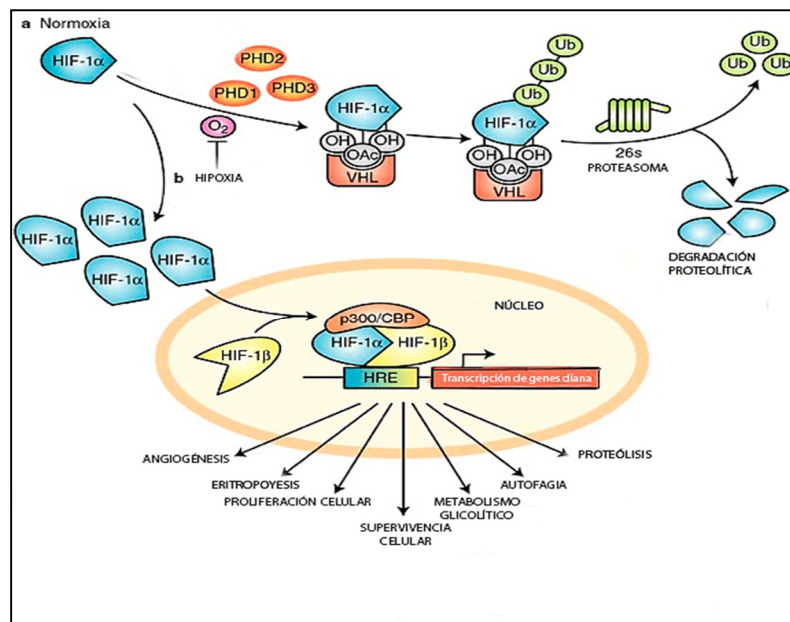
Para constituirse el heterodímero HIF-1 dentro del núcleo, la subunidad  $\alpha$  debe translocarse y ser capaz de unirse a la subunidad  $\beta$ . En condiciones de normoxia, los residuos de prolina 402 y 564 de la proteína HIF-1 $\alpha$ , localizados dentro de la región ODDD (figura 9), son hidroxilados mediante la acción de la familia de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato, hierro y oxígeno, con

dominios prolina-4-hidroxilasas denominadas PHDs (*prolyl-hydroxylase domain*). Estas hidroxilaciones constituyen la primera señal para la degradación de HIF-1 $\alpha$ . De estos dos residuos de prolina, el 564 es fundamental para que ocurra su degradación (71, 72).

Una vez que estos residuos son hidroxilados ocurre la unión con la proteína supresora de tumores pVHL (*Von Hippel-Lindau*) y juntos forman un complejo multienzimático que une la cadena de poliubiquitina a HIF-1 $\alpha$  marcándolo como diana de degradación por el proteasoma (figura 10). Junto a pVHL, el complejo está constituido por las proteínas elongina B, elongina C, Cul2 y Rbx y la ligasa E3. Estas proteínas son reconocidas por el proteasoma 26S (75).

Además, el residuo de asparagina 803, localizado en el dominio TAD del extremo C-terminal es hidroxilado por el factor inhibidor de HIF o FIH (*factor inhibiting HIF*). Este residuo de asparagina no interviene en el proceso de degradación, pero regula la capacidad transcripcional de HIF-1. Mientras estos residuos estén hidroxilados no ocurre la interacción con las proteínas nucleares p300 o CBP, necesaria para el correcto funcionamiento de la actividad transcripcional de HIF-1 (64).

Cuando las células están expuestas a condiciones de hipoxia, las enzimas hidroxilasas no pueden ejercer su acción, inhibiendo la degradación de HIF-1 $\alpha$ , que no es hidroxilado y, por tanto, se acumula en el citoplasma. Posteriormente, puede ser translocado al núcleo al unirse a las proteínas importinas (76). En el núcleo, HIF-1 $\alpha$  se une con la subunidad nuclear  $\beta$  y constituye el factor de transcripción activo que se une a las secuencias de DNA HRE, activando su transcripción y, como resultado, la célula se adapta a la hipoxia, activando mecanismos de supervivencia celular, angiogénesis y autofagia (figura 10) (76).



**Figura 10. Mecanismo celular de respuesta a hipoxia. (Adaptado de (77)).** A: Ubiquitinación y degradación de HIF-1 $\alpha$  en condiciones normales. B. Activación y acumulación de HIF-1 $\alpha$  en presencia de hipoxia, así como la activación de genes que presentan promotores con elemento HRE.

### 3.4 HIPOXIA Y ACTIVACIÓN DE LA AUTOFAGIA

Las células eucariotas han desarrollado múltiples mecanismos para contrarrestar situaciones de estrés, como la hipoxia, y en función de ésta coordinar de forma adecuada procesos celulares claves para su supervivencia. Un punto de control importante es la proteína mTOR, que puede promover el crecimiento celular cuando las condiciones ambientales son favorables o bien suprimir rápidamente la biosíntesis y potenciar el reciclaje de proteínas. Esta doble función de mTOR proporciona un modo por el cual la célula tendría una fuente interna de metabolitos, reduciendo o parando la tasa de proliferación para evitar un desbalance energético y la muerte celular (78).

La proteína mTOR pertenece a la familia de las quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-quinasa (PIKs). Es la subunidad catalítica de dos complejos diferentes denominados complejo mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es un homodímero formado por cuatro proteínas accesorias que se unen a mTOR: RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*), mLST8 (*mammalian Lethal with Sec13 protein 8*), PRAS40 (*ProlineRich AKT Substrate 40 kDa*) y Deptor (*DEP-domain-containing mTOR-interacting protein*). RAPTOR cumple numerosas funciones, entre las cuales se incluye el ensamblaje de mTORC1. mTORC2 forma también un complejo y entre todos sus componentes, se define por la interacción de mTOR con la subunidad RICTOR (*Rapamycin-insensitive companion of mammalian target of rapamycin*), esencial para su actividad catalítica y mutuamente excluyente con RAPTOR en su unión a mTOR. Tanto los estímulos que regulan su actividad como sus dianas de actuación son mucho menos conocidos que los de mTORC1 (79).

La regulación de mTORC1 está sometida a un estrecho control. Uno de los sensores más importantes que regula su actividad es el complejo TSC1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex*) el cual es un represor de esta proteína. TSC1/2 actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) de una proteína G pequeña, RHEB (*Ras homolog enriched in brain*). La forma activa de RHEB, interacciona directamente con mTORC1 para estimular su actividad. Con su actividad GAP, TSC1/2 regula negativamente mTORC1 convirtiendo RHEB a su forma inactiva (figura 11) (80).

Varios grupos de investigación han observado que, en condiciones de hipoxia se activa el complejo TSC1/2 a través de la inducción transcripcional de la proteína REDD1 (*Protein Regulated in Development and DNA Damage Response 1*) vía HIF-1 $\alpha$ . REDD1 regula negativamente a mTORC1 mediante la liberación de TSC2 de su interacción inhibitoria con las proteínas 14-3-3 (figura 11). Además, se ha descrito que tanto el supresor tumoral PML como la proteína inducible por HIF-1 $\alpha$ , BNIP3 (*BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3*), reducen la actividad de mTORC1 en situaciones de hipoxia mediante la disrupción de la interacción entre mTORC1 y RHEB, activando diferentes procesos entre los cuales se incluye la autofagia (figura 11) (80).

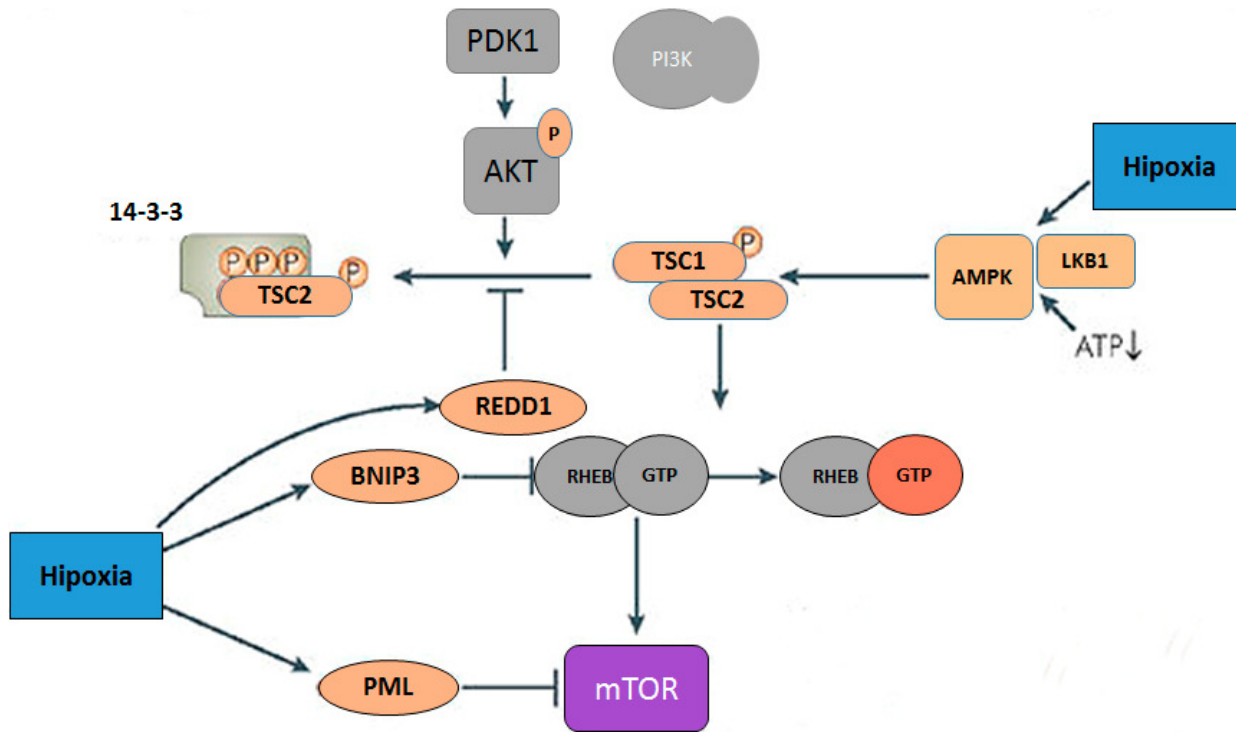


Figura 11. Inhibición del complejo mTOR mediante hipoxia. (Adaptado de (61)).

El mecanismo por el cual se induce la autofagia en condiciones hipóxicas aún no se ha demostrado, sin embargo, diferentes autores han reportado que la proteína BNIP3 puede influir en la autofagia inducida por hipoxia. La expresión de BNIP3 puede generar la interrupción de la interacción entre la proteína Beclin 1 y Bcl2 o Bcl-xL, liberando a la proteína Beclin 1 y generar la activación de la autofagia (81).

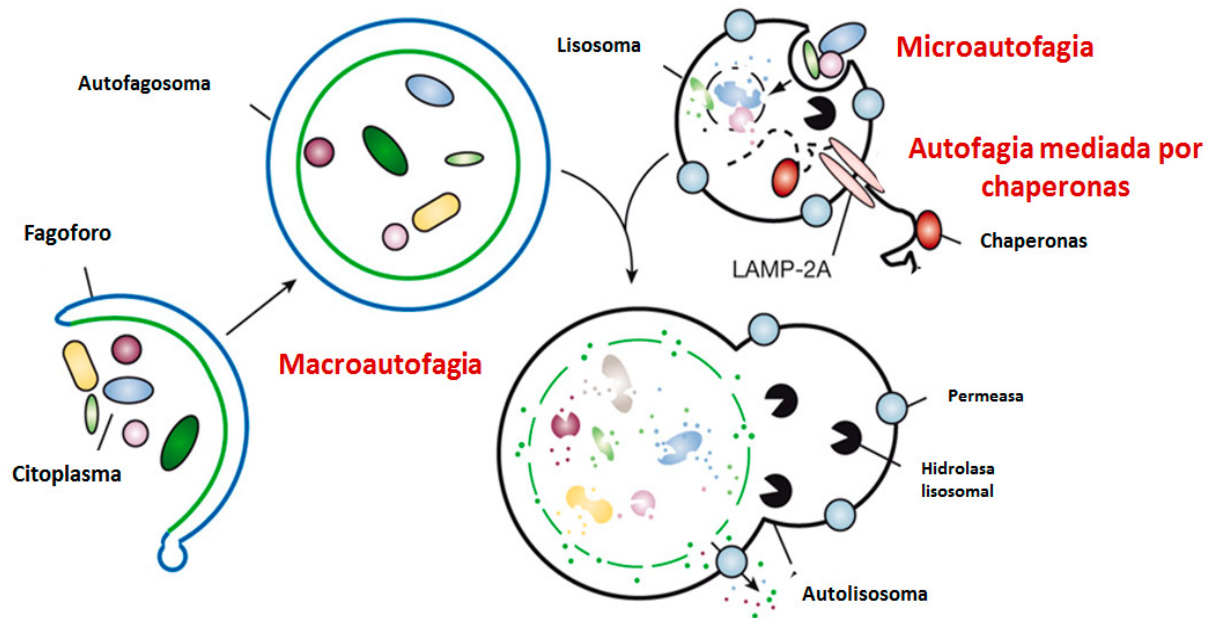
## 4. AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo de degradación lisosomal altamente regulado y muy conservado evolutivamente. Es una vía de degradación de macromoléculas (proteínas, lípidos, glucógeno y nucleótidos) y también de orgánulos. Es un proceso homeostático fundamental en la célula y se conserva en todos los organismos eucarióticos, desde levaduras hasta humanos (82).

En organismos eucariotas existen tres tipos principales de autofagia, la mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia (83). En la primera, proteínas diana solubles que tienen un pentapéptido particular son reconocidas por proteínas chaperonas como la Hsc-70 y trasladadas al lisosoma a través de la proteína LAMP-2A (*lysosome associated membrane protein 2*), resultando en su degradación. En la microautofagia, el material citoplasmático a degradar es directamente engullido



por el lisosoma por reestructuración de su membrana. Finalmente, en la macroautofagia (a la que, a partir de ahora, nos referiremos como autofagia), vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, engullen proteínas de vida larga, orgánulos dañados o incluso patógenos y los traslada a los lisosomas. Allí, la membrana exterior del autofagosoma se fusiona con la del lisosoma y su membrana interior y el contenido que transporta se degrada. Las macromoléculas resultantes de la degradación son transportadas de nuevo al citosol para su reutilización (figura 12) (84).



**Figura 12. Diferentes modalidades de autofagia (Adaptado de (85)).** La figura resume los diferentes tipos de autofagia (macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas).

#### 4.1 BASES MOLECULARES DE LA AUTOFAGIA.

El estudio molecular implicado en el proceso de autofagia tuvo su inicio hace 15 años, principalmente en levaduras (*S. cerevisiae*) y en hongos (*P. pastori* y *H. polymorpha*), permitiendo la identificación de 32 genes que regulan la ruta, llamados genes autofágicos ATGs (*Autophagy Related Genes*). Numerosos homólogos han sido identificados en eucariotas superiores (ATG), sugiriendo que la autofagia es un proceso altamente conservado en la evolución (tabla 4) (86).

Tabla 4. Proteínas implicadas en la autofagia en mamíferos, sus homólogos en levaduras y sus funciones (86).

PROTEÍNA EN MAMÍFERO	HOMÓLOGO EN LEVADURAS	FUNCIÓN
ULK1/2	Atg1	Ser/Thr quinasa. Forma parte del complejo ULK1/2
ATG2A, B	Atg2	Proteína de membrana. Se une a WIPI4 y recluta a ATG9
ATG3	Atg3	Importante en la conjugación de LC3 con PE
ATG4A, B, C y D	Atg4	Cistein proteasa que procesa Pro-LC3
ATG5	Atg5	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
Beclin1	Atg6	Componente del complejo Vps34 PI3P quinasa
ATG7	Atg7	Importante en la conjugación de ATG12-5 y ATG8-PE
LC3A, B y C	Atg8	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
GABARAP	Atg8	Marcador del autofagosoma por conjugación con PE
GABARAPL1	-	-
GATE-1TG106	-	-
ATG9	Atg9	Proteína de membrana importante en la expansión del autofagosoma
ATG10	Atg10	Importante en la conjugación de ATG12-ATG5
ATG12	Atg12	Forma parte del complejo ATG12-ATG5
ATG13	Atg13	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
ATG14L	Atg14	Subunidad del complejo Vps34 PI3P quinasa
ATG16L1	Atg16	Forma complejo ATG12-5 y participa en la conjugación ATG8-PE
FIP200	Atg17	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
WIPI1/2/3/4	Atg18, Atg21	Proteína de unión a ATGs
ATG101	-	Componente del complejo ULK1/2 quinasa
AMBRA1	-	Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
P150	VPS15	Subunidad reguladora del complejo Vps34 PI3P quinasa
RUBIRON	-	Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
UVRAG	-	Regulador del complejo Vps34 PI3P quinasa
VPS34	Vps34	PI3 quinasa

## 4.2 SEÑALIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA

La autofagia se lleva a cabo en varias etapas. Inicialmente una porción del citoplasma, incluyendo orgánulos, es englobada por una membrana aislada (el fagoforo). Posteriormente, tras una etapa de nucleación y de expansión de la doble membrana se forma un autofagosoma que se fusionará con el lisosoma para formar el autofagolisosoma, en el que se degradará el contenido por la acción de enzimas lisosomales (figura 12) (86).

### a) Formación de fagoforo

La proteína que inicia el mecanismo autofágico es la quinasa ULK1 (*Unc-51-like kinase 1*), la cual forma un complejo tetramérico con ATG13, la proteína de andamiaje FIP200 (*focal adhesion kinase family interacting protein 200kD*) y la proteína ATG101, que se une y estabiliza a ATG13. ULK1

es capaz de fosforilar a las proteínas ATG13 y FIP200, induciendo la autofagia (figura 13). El complejo ULK1 quinasa está regulado por mTORC1. Bajo condiciones normales el complejo mTORC1 interactúa con el complejo ULK1 quinasa y fosforila a ULK1 y ATG13, inhibiendo de esta manera la actividad de ULK1 (figura 13). En situación de privación de nutrientes, nitrógeno o ATP el complejo mTORC1 es inactivo y se disocia del complejo ULK1 quinasa, permitiendo a ULK1 fosforilar los otros componentes del complejo y a sí misma, dirigirse al sitio de ensamblaje del fagoforo y activar la autofagia (figura 13) (86).

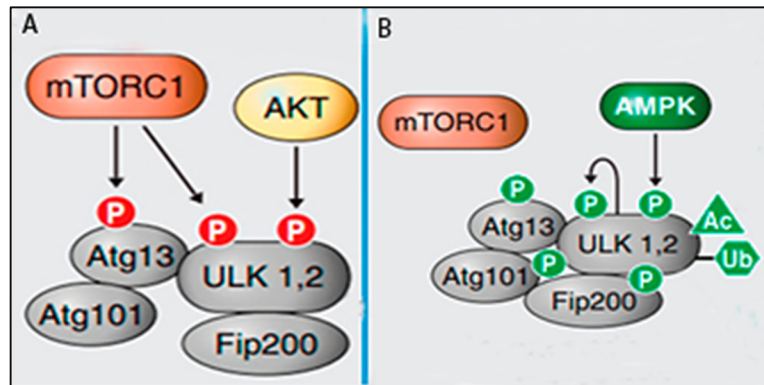


Figura 13. Complejo ULK1 A. Complejo inactivo B. Complejo activo (87).

## b) Nucleación del fagoforo

La nucleación del fagoforo requiere la activación de un complejo proteico fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3K) de clase III. Este complejo se forma con la interacción de las proteínas Vps34 ((*PI3K catalytic unit 3*), p150 y Beclin1 (figura 14) (88).

La proteína Beclin1 se une a Vps34, lo cual es necesario para que Vps34 sea capaz de fosforilar el fosfatidil-inositol 2 fosfato (PIP2) a fosfatidil-inositol 3-fosfato (PI3P), que permite reclutar las proteínas al fagoforo para el crecimiento de la membrana. Por otra parte, Beclin1 es importante en la regulación de la nucleación del autofagosoma. Esta proteína presenta un dominio ECD que permite la unión al complejo PI3K-III/Vps34. Generalmente, Beclin1 interactúa con Bcl-2 y homólogos a este (BCL-x y Mcl-1) a través de su dominio BH3. En condiciones normales Bcl-2 inhibe a Beclin1 (figura 14), mientras que, en condiciones de estrés, Beclin1 se disocia de Bcl-2, permitiendo la activación de Vps34 y estimulando consecuentemente la autofagia (89).

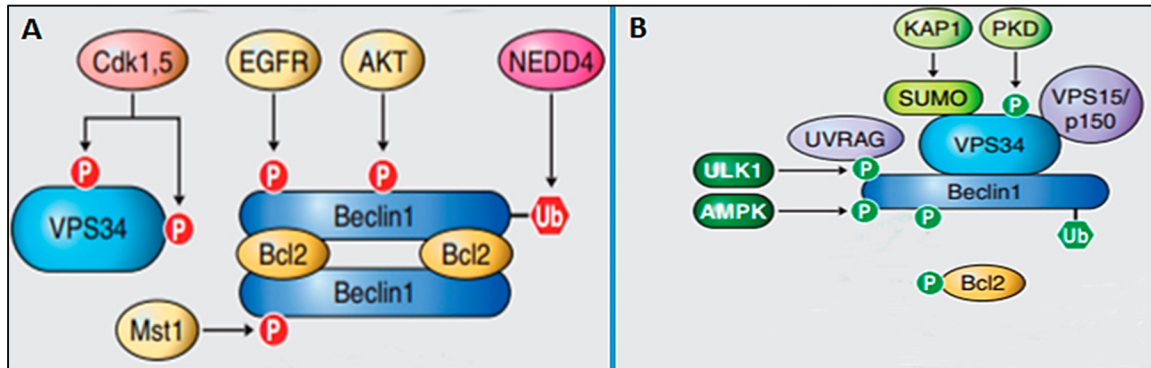


Figura 14. Activación del complejo PI3K de clase III. Complejo inactivo B. Complejo activo( 85).

### c) Expansión de la membrana y cierre del autofosoma

El mecanismo de expansión de la membrana ocurre simultáneamente a la nucleación de las vesículas. En esta etapa intervienen principalmente dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina (*Ubiquitin-like, Ubl*) (89).

El primer sistema de conjugación engloba a las proteínas ATG12, ATG5 y ATG16L1. La conjugación entre ATG12 y ATG5 se realiza a través de la glicina C-terminal de ATG12, que se activa mediante la unión por un enlace tioéster de alta energía con el residuo de cisteína 572 de ATG7 (*E1-like*). Posteriormente, ATG12 es transferida a ATG10 (*E2-like*) y, finalmente, se une a un residuo de lisina de ATG5, formando el complejo ATG12-ATG5 mediante un enlace isopeptídico. Este complejo interactúa con ATG16L1, formando el complejo proteico multimérico de 350 kDa, que es esencial en la formación del pre-autofosoma (figura 15) (87, 88).

En el segundo sistema se produce la conjugación de LC3. Esta proteína es sintetizada como precursor pro-LC3, e inmediatamente procesada por la proteína ATG4 para obtener su forma citosólica LC3-I (figura 15). Luego ATG7 y ATG3 permiten la lipidación de la proteína LC3-I a una fosfatidiletanolamina (PE) de la membrana autofososomal dando lugar a LC3-II que se ancla a las membranas interna y externa del autofosoma (figura 15). LC3-II es la única proteína específica de los autofosomas, por lo que permite su empleo como marcador de sus niveles. Las moléculas de LC3-II de la parte citosólica son recicladas por ATG4 en LC3-I y fosfatidiletanolamina, mientras que las moléculas de LC3-II de la parte luminal del autofosoma permanecerán en el mismo y son degradadas posteriormente por las catepsinas lisosomales. LC3-II, permaneciendo ahí hasta la fusión con el lisosoma (84, 87, 89).

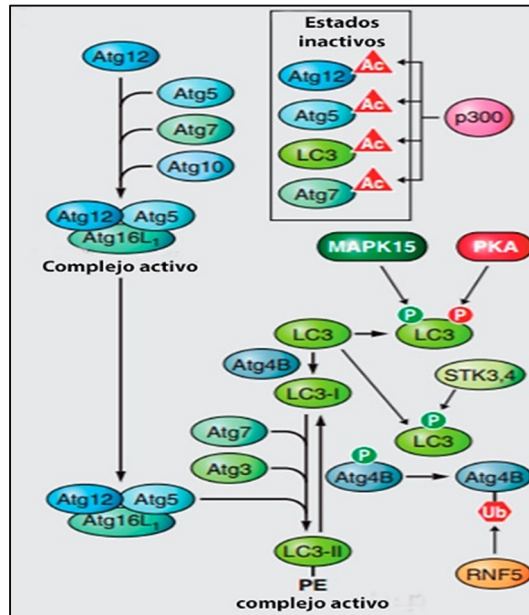


Figura 15. Sistemas de conjugación responsables de la expansión de la membrana (89).

Además, la proteína ATG9 se ha descrito recientemente como esencial en la expansión de la membrana del autofagosoma al funcionar como transportador para abastecer la membrana emergente. En este proceso están implicados la proteína ATG16L1 y el complejo ATG2 y WIPI4 (92).

Posteriormente, se produce el cierre del autofagosoma. Existen muy pocas evidencias sobre las proteínas que intervienen en este proceso, pero algunos autores han sugerido que podrían estar regulados por las proteínas ATG2A y ATG2B (93). Se ha descrito también que otras proteínas, como las GTPasas Rab22, Rab24 y Rab7, la proteína VAMP-3 (*vesicle-associated membrane protein 3*) y NSF (*N-ethylmaleimide-sensitive factor*) o la maquinaria ESCRT, podrían ser importantes en este proceso (94, 95). Cuando el autofagosoma está formado, las moléculas de LC3-II, unidas a la membrana, se separan mediante la acción de ATG4 y vuelven al citosol (96).

#### d) Formación del autolisosoma y degradación.

La última etapa del proceso de autofagia es la fusión entre los autofagosomas maduros y los lisosomas para generar los autofagolisosomas. Para que ocurra la unión de ambas vesículas se requiere la acción de los microtúbulos. Este proceso se lleva a cabo por la acción de las dineínas, las cuales permiten que estas dos estructuras se encuentren (97,98).

Los mecanismos moleculares implicados en esta etapa del proceso están por esclarecer. Sin embargo, se conoce que las proteínas de la membrana lisosomal LAMP2, CLN3 y Rab7, el complejo PI3K de clase III, así como el sistema ESCRT pueden estar involucrados. Recientemente se ha descrito que la proteína ATG14 (*Beclin1-associated autophagy-related key regulator (Barkor) or ATG14L*) promueve la fusión mediante la proteína SNARE STX17. Una vez formado el autolisosoma, se lleva a cabo la degradación de la carga celular por enzimas hidrolíticas, tales como cisteín proteasas o las

catepsinas B, D o L. Las moléculas generadas por la degradación, mayoritariamente aminoácidos, vuelven al citosol para la síntesis proteica y el mantenimiento de las funciones celulares (90).

La autofagia se considera un mecanismo de supervivencia celular altamente regulado. De hecho, es crucial en el mantenimiento de los procesos fisiológicos pero, a lo largo de los años, numerosas investigaciones han implicado a este proceso en diferentes enfermedades entre las que se encuentran: enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo 2, enfermedades infecciosas, cardiomiopatías, enfermedades relacionadas con el envejecimiento y el cáncer (99).

## 5. AUTOFAGIA Y CÁNCER

La relación que existe entre la autofagia y el cáncer es compleja debido a que se ha sugerido que tiene una doble función en esta enfermedad. Múltiples trabajos indican que esta doble función depende de numerosos factores, entre los que se incluyen el estadio tumoral, el contexto celular y el tejido de origen (97, 98).

La autofagia puede actuar como una vía de supresión tumoral, evitando la acumulación de orgánulos y proteínas dañadas; y/o como mecanismo de supervivencia celular, promoviendo el crecimiento de tumores establecidos (101).

Algunos estudios han demostrado que células pre-malignas muestran niveles basales de autofagia más bajos que en células normales. Además, se ha observado que alteraciones habituales en células tumorales, como la amplificación de la proteína quinasa B (AKT o PKB), mutaciones en PI3K o la pérdida de la proteína PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa), se asocian a una disminución de la autofagia. Otros trabajos han encontrado mutaciones de cambio de fase de lectura en los genes *ATG2B*, *ATG5*, *ATG9* y *ATG12*, mutaciones puntuales o deleciones en varios reguladores autofágicos y la deleción homocigota de Beclin1 en un alto número de tumores humanos, entre los que se incluye mama, ovario y próstata (100, 101). Estudios realizados en ratones demuestran que alteraciones en *ATG5*, *ATG7* o Beclin1, facilitan la iniciación tumoral, así como también se ha asociado con la susceptibilidad al estrés metabólico, acumulación de mitocondrias, proteínas dañadas e inestabilidad genómica (104). Estas evidencias indican que la autofagia puede actuar como supresor tumoral, previniendo la transformación oncogénica de las células y alteraciones en este proceso contribuyen a la progresión de los tumores (105).

Se ha relacionado autofagia y tumorigénesis a través de la elevación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (106). Diferentes trabajos han demostrado que la acumulación de ROS causa daño al DNA y conduce a la inestabilidad genómica. Una de las proteínas implicadas en promover estrés oxidativo y crecimiento tumoral es la proteína p62 o proteína del sequestrósoma1 (106). Se ha demostrado que esta macromolécula interviene el proceso de la autofagia selectiva, mecanismo que permite la eliminación específica de agregados proteicos, orgánulos dañados o patógenos (figura 16)

(107). Una de las características principales es su capacidad para ubiquitinar a otras proteínas. Este marcaje es posible gracias al dominio UBA (108). Cuando se produce la dimerización de la proteína p62 a través de su dominio PB1 ocurre la unión y ubiquitinización de las proteínas que serán eliminadas a través del dominio UBA. Para finalizar, los agregados de proteínas se anclan a la membrana del autofagosoma (109). Este anclaje se produce por la interacción entre la proteína p62 (a través de su dominio LIR) y la proteína LC3. Tanto p62 como LC3 serán eliminadas en el proceso de autofagia junto con el resto de proteínas previamente marcadas (figura 16) (110).

Estudios realizados con células tumorales que presentan deficiencias en el mecanismo autofágico mostraron acumulación de mitocondrias dañadas y proteínas mal plegadas (111). Esta acumulación puede conllevar la elevación de ROS, que contribuye a la inducción de p62 (112). La expresión elevada de p62 induce ROS, sugiriendo un posible bucle de amplificación.

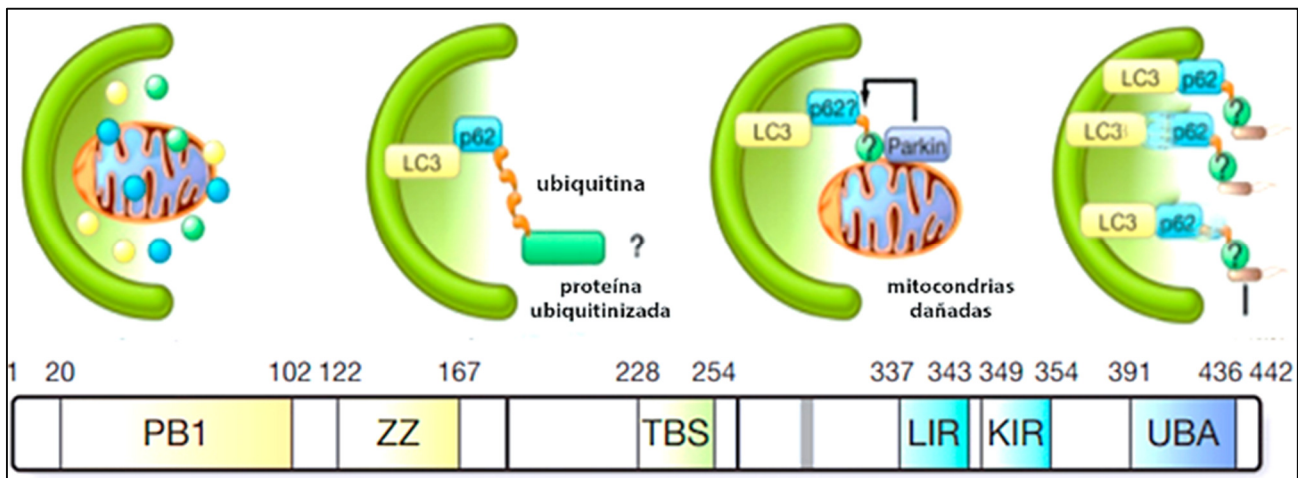


Figura 16. Representación gráfica de los dominios de la proteína p62 y su implicación en la eliminación de proteínas ubiquitinizadas mediante el proceso de autofagia (105, 109).

La forma en que la autofagia puede ser un mecanismo de protección frente a la iniciación tumoral no está clara, pero se ha sugerido que al limitar la acumulación de proteínas u orgánulos dañados previene la inestabilidad genómica, limita la inflamación causada por necrosis, elimina las especies reactivas de oxígeno y evita el daño en el DNA. Esto permitiría la degradación de las proteínas necesarias para la proliferación celular o promover la muerte autofágica de la célula y evitaría la tumorigénesis (114).

Por el contrario, cuando los tumores ya se encuentran establecidos presentan regiones en donde el suministro de nutrientes y vasos sanguíneos es reducido, lo que genera regiones tumorales hipóxicas. Estas situaciones de estrés conllevan a la activación del mecanismo autofágico, sobre todo en los casos en los cuales los tumores presentan fallos en el proceso apoptótico (113, 114). Esta activación permite la supervivencia de las células ya que mantiene la producción de energía. En estos casos, las células tumorales pueden sobrevivir, llegando a ser menos de un tercio de su tamaño normal. Durante el proceso de consumo celular a través de la autofagia se suprime la división celular,

lo que representa el esfuerzo de conservación de energía. Estas células tumorales aparentemente "inactivas" retienen la capacidad de volver a su tamaño normal y reanudar la proliferación celular (102). De este modo, la autofagia confiere una tolerancia superior al estrés que limita el daño, mantiene la viabilidad y facilita la recuperación. Estas células resisten a la radiación y quimioterapia para reactivarse en un momento posterior. El mecanismo por el cual las células tumorales alcanzan este estado de latencia y se recuperan necesita ser esclarecido, así como la relevancia que tiene la autofagia en estos procesos necesita ser definido, ya que es una barrera fundamental para el éxito del tratamiento contra el cáncer (113).

Por tanto, la autofagia es un proceso altamente selectivo que permite una degradación celular extensa manteniendo al mismo tiempo la integridad funcional (100, 107, 108, 115).

## 6. MODULADORES DE LA AUTOFAGIA

La autofagia tiene una función dual en el desarrollo y la progresión de procesos tumorales, por lo que tanto su activación como represión pueden ser aproximaciones terapéuticas válidas contra el cáncer (118). La autofagia excesiva puede contribuir a la muerte celular programada tipo II o muerte autofágica en algunas condiciones. Este tipo de muerte se diferencia de la apoptosis en que está asociada a un aumento en el número de autofagosomas y no depende de la acción de las caspasas. Por lo tanto, la mejora farmacológica en moléculas activadoras de la autofagia puede contribuir al tratamiento del cáncer, particularmente útiles en el caso de tumores resistentes a apoptosis en los que fármacos proapoptóticos no tienen efecto (119).

Por otra parte, la inhibición de este proceso puede representar otro método terapéutico anticancerígeno ya que evitaría su función de promoción de la supervivencia en células tumorales en situaciones de estrés conduciendo a las células tumorales a la muerte apoptótica, por lo que se trataría de una aproximación terapéutica válida en tumores sin alteraciones en la ruta de apoptosis (120).

Una serie de moduladores autofágicos se han propuesto como agentes terapéuticos contra el cáncer cuando se utilizan de forma única o en combinación con otros fármacos (120).

### 6.1 ACTIVADORES AUTOFÁGICOS

Entre los fármacos activadores de la autofagia destacan los inhibidores de mTOR. El más habitual de estos inhibidores es la rapamicina o sus derivados. Recientemente, la nueva generación de inhibidores competitivos de ATP, PP242 y Torin 1, han mostrado potencial inducción de la autofagia. Además, a diferencia de la rapamicina pueden inhibir la fosforilación de mTORC1 y mTORC2. Torin1 exhibe 1.000 veces mayor selectividad por mTOR que por PI3K e induce la detención del ciclo celular



(121). No obstante, la represión de mTOR activa AKT, por lo que se podrían contrarrestar los efectos antitumorales. Una terapia combinada de inhibidores de mTOR y AKT podría mejorar el resultado. Además, se sabe que mTOR también se inhibe al inducir a la proteína AMPK (proteína quinasa activada por amp). La administración de activadores de AMPK como metformina, fármaco antidiabético de uso habitual, genera la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, lo que provoca una disminución de la cantidad de ATP e incrementa AMPK (120, 121). Otros estudios han observado que ciertos alcaloides activan la autofagia. Recientemente se ha demostrado que los alcaloides incluyendo berberina, matrina y tetrandrina exhiben efectos anticancerígenos a través del paro del ciclo celular, lo que conlleva a la inhibición de metástasis o angiogénesis (121). Otros activadores autofágicos son los inductores de estrés de retículo endoplasmático o inductores de inanición, como los inhibidores PI3K clase I, inhibidores tirosina quinasa, inhibidores de proteasoma, inhibidores de la inositol monofosfatasa e inhibidores de histona desacetilasas como Panobinostat® (LBH589) (118, 122).

## 6.2 INHIBIDORES AUTOFÁGICOS

Recientemente se ha sugerido que el tratamiento con inhibidores de la autofagia puede evitar la función del mecanismo de supervivencia en células tumorales, proporcionando opciones de tratamiento más eficaces contra el cáncer. Uno de los inhibidores más utilizados están la cloroquina (CQ) y la hidroxiclороquina (HCQ), dos fármacos antimaláricos de uso común. Ambas actúan aumentando el pH del lisosoma, inhibiendo la actividad de las hidrolasas y del autofagolisosoma. Diversos trabajos han demostrado que ejercen actividades anticancerígenas en varios tipos de neoplasias (123, 124) y tienen baja toxicidad frente a células epiteliales no tumorales (126).

Debido a su efecto antitumoral, estos inhibidores se han utilizado en diversos ensayos clínicos en combinación con fármacos quimioterapéuticos como inhibidores de BRAF. En estos ensayos se ha observado que su tratamiento genera resultados exitosos contra ciertos tipos de cáncer (124). Otros estudios más recientes han utilizado la CQ como agente terapéutico único, incluyendo a pacientes con diversos tipos de cáncer como mama, pulmón, próstata, páncreas, glioblastoma y melanoma, pero aún no se ha logrado identificar inicialmente cuáles presentan mayor beneficio. Otros ensayos clínicos se han dirigido a diferentes neoplasias para evaluar los efectos de la inhibición de la autofagia con CQ en combinación con radiación, quimioterapias citotóxicas convencionales y agentes que generan daño al DNA, inhibidores de histonas des-acetiladas, inhibidores de proteasoma, inhibidores mitóticos, antiandrógenos y varios inhibidores de quinasa (124).

Otro fármaco que también se ha utilizado como inhibidor autofágico es la 3-metiladenina (3-MA). Esta molécula inhibe la actividad del complejo PI3K de clase III, que se requiere para la formación del fagoforo y el autofagosoma. Además, suprime la inducción de mTOR tanto en condiciones ricas en nutrientes como en condiciones de privación (121). Estudios realizados en células de carcinoma colorrectal indican que la inhibición con 3-MA podría mejorar los efectos terapéuticos del 5-fluorouracilo (5-FU), y el uso combinado de 3-MA y cisplatino también podría fortalecer la muerte celular apoptótica

inducida por cisplatino en células de carcinoma de células escamosas esofágicas. Sin embargo, la homología entre PI3K de clases I y III hace que muchas veces estos compuestos induzcan también la autofagia(121).

Por otra parte, otros inhibidores de autofagia actúan en etapas más tardías del proceso como son los inhibidores de microtúbulos que evitan la fusión del autofagosoma y el lisosoma. Otro fármaco que inhibe esta fusión es la bafilomicina A, el cual es inhibidor de la enzima ATPasa-vacuolar. Estudios realizados en células de CCR sugieren que este inhibidor puede inducir un paro en el ciclo celular y conllevar a la apoptosis. Además, se ha observado que la terapia en conjunto con sulforafano, fármaco quimioterapéutico convencional, puede aumentar la citotoxicidad del mismo en células de cáncer de mama, por lo cual se ha sugerido como estrategia antitumoral para este tipo de cáncer(120).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El CCR es un tumor con elevada incidencia y prevalencia. Es el tercer tipo de cáncer más común en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial (5). En la etiología de esta enfermedad se ven implicados diferentes factores, tanto ambientales como genéticos. Se ha descrito que síndromes bien caracterizados como la PAF y el cáncer colorrectal no polipósico (HNPCC) que conllevan al desarrollo tumoral (36).

Los tumores sólidos progresan en un ambiente de hipoxia; así se observa que las células tumorales son resistentes a la apoptosis y se acompañan de un aumento de la angiogénesis, volviéndose más agresivas, con mayor capacidad invasora y resistentes al tratamiento (127).

Diferentes estudios indican que los mecanismos biológicos necesarios para generar la progresión tumoral en condiciones de hipoxia son activados por el factor inducible por hipoxia (HIF). Esta proteína presenta dos sub-unidades, la sub-unidad  $\beta$ , que se expresa constitutivamente y la subunidad  $\alpha$ , que se degrada en condiciones normales. Al disminuir la disponibilidad de oxígeno, la sub-unidad  $\alpha$  no es degradada y permitirá la activación transcripcional de un conjunto de genes que contribuyen a la supervivencia y progresión tumoral (127).

Uno de los mecanismos que puede intervenir en la supervivencia celular en condiciones hipóxicas es la autofagia. Este proceso, conservado evolutivamente, permite la degradación intracelular de proteínas de larga vida y orgánulos, pero en condiciones de estrés, como es la hipoxia, puede favorecer la preservación de la energía y nutrientes a través del reciclaje de proteínas, evitando la muerte celular, lo que conlleva a la supervivencia y progresión tumoral (128). En la última década se ha demostrado que la autofagia está implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades, entre ellas el cáncer(114).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos planteamos como hipótesis del trabajo que el proceso de autofagia podría estar relacionado con el desarrollo del CCR, por lo que se puede considerar como una posible diana terapéutica para esta enfermedad. Por todo ello, nos planteamos como objetivos

1- Determinar si variantes alélicas en genes implicados en la ruta de autofagia podrían estar relacionados con el riesgo a padecer CCR.

2- Analizar el efecto de la hipoxia (1% oxígeno) en la viabilidad celular y en el proceso autofágico en líneas celulares de CCR (HCT116 y HT29).

3- Analizar el efecto de mimetizadores de hipoxia en la viabilidad, morfología y capacidad migratoria, así como su efecto en el proceso autofágico en líneas celulares de CCR (HCT116 y HT29).

4- Estudiar el efecto de los fármacos Decitabina®, Panobinostat®, cloroquina, metformina y paclitaxel, en la viabilidad celular y en el proceso autofágico para comparar su efecto al ser combinados con mimetizadores de hipoxia en líneas tumorales de CCR y así determinar nuevas estrategias terapéuticas en el tratamiento de este tumor.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. PACIENTES Y CONTROLES

Los estudios de asociación de polimorfismos de genes relacionados con la autofagia se realizaron a partir de muestras de DNA extraído de sangre periférica. Para el análisis de asociación fueron incluidos 332 pacientes diagnosticados con CCR esporádico, 103 pacientes con sospecha de SL y 33 pacientes con sospecha de PAF. Estas muestras fueron remitidas desde diferentes hospitales de la Comunidad de Castilla y León entre los años 2000 y 2014. Como grupo control se analizaron muestras de DNA de sangre periférica de 264 individuos mayores de 60 años que no tenían historia personal ni familiar de cáncer. En todos los casos, las muestras se obtuvieron mediante venopunción antecubital, se recogieron en tubos de 10 mL con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se conservaron a 4°C hasta su procesamiento.

Todas las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado, siguiendo las normas legales para Estudios Clínicos en España por criterios de Helsinki.

## 2. EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción de DNA de alto peso molecular se realizó a partir de sangre periférica. Para ello se utilizaron 10 mL de cada muestra. Estas fueron centrifugadas para obtener la interfase de células mononucleadas. Posteriormente, se realizó la lisis osmótica de los eritrocitos con agua bidestilada estéril (ddH<sub>2</sub>O). Este procedimiento se realizó dos veces con la finalidad de obtener mayor cantidad de células leucocitarias. Una vez recuperado el botón celular, el cual contiene únicamente las células nucleadas, se resuspendió en tampón Fornace (0,25 M sacarosa, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>) y se centrifugó a 15.000 r.p.m. por diez minutos. El *pellet* obtenido se resuspendió nuevamente en tampón Fornace, al que se le añadió EDTA (10 mM a pH 8,0) para posibilitar la inactivación de las nucleasas, 50 µg/mL de proteinasa K (ApliChem Darmstadt, Alemania) para degradar las proteínas y dodecilsulfato sódico (SDS) a una concentración final del 1% para romper las membranas celulares. La mezcla se incubó a 55°C durante 8-16 horas.

Posteriormente, se procedió a la extracción y purificación del DNA. La mezcla se incubó con fenol cloroformo tamponado a pH 8 y CIAA (cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1) (Panreac Química S.L.U., Barcelona, España) y se sometió a centrifugación para separar las diferentes fases. El DNA, que permaneció en la fase acuosa, se extrajo de la mezcla y se limpió de posibles residuos con CIAA (Panreac Química S.L.U.). Se centrifugó de nuevo para separar las fases, una con el DNA y otra con los detritos

celulares. Tras ello, se aisló la fase que contenía el material genético y se precipitó con etanol absoluto frío. El DNA se lavó con etanol al 70% y por último se resuspendió en 200  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O. Para determinar la concentración y la pureza del DNA se midió la absorbancia a 260 y 280 nm, en un espectrofotómetro automático Nanodrop® ND2000 (Thermo Fisher Scientific, Johannesburgo, Sudáfrica). En los casos en los que se encontró contaminación por proteínas, solventes orgánicos o RNA se procedió a realizar una nueva purificación (además de tratamiento con RNAsas en el caso del RNA). Las muestras de DNA obtenidas se almacenaron en tubos a -20°C para evitar su degradación progresiva y una posible contaminación por microorganismos.

### 3. DISCRIMINACIÓN ALÉLICA POR SONDAS TAQMAN™

El genotipado de polimorfismos de genes relacionados con la autofagia se llevó a cabo mediante discriminación alélica con sondas TaqMan™ (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

En la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con sondas TaqMan™ los procesos de amplificación y detección se produjeron de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Esta técnica se basa en la fluorescencia emitida por sondas específicas marcadas con fluorocromos. Estas sondas son oligonucleótidos que hibridan específicamente con cada alelo y están marcadas con un fluorocromo donador en el extremo 5', que emite fluorescencia al ser excitado, y un aceptor (*quencher*) en el extremo 3', que absorbe la fluorescencia liberada por el donador cuando la sonda está intacta y ambos se encuentran próximos. Durante la reacción de amplificación del DNA diana, la sonda hibrida con su cadena complementaria y la Taq Polimerasa al ejercer su actividad 5' exonucleasa, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda, liberándose así el fluorocromo donador. En este momento, donador y aceptor están espacialmente alejados, por lo que el lector capta la fluorescencia del primero (figura 18) (129).

En todos los ensayos de discriminación alélica mediante PCR con sondas TaqMan™ los fluorocromos empleados fueron VIC y FAM (tabla 5). Para cada polimorfismo o SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) analizado se emplearon dos sondas, cada una de las cuales reconoció una de las dos posibles variantes nucleotídicas del polimorfismo. Además, los termocicladores utilizados para llevar a cabo estos ensayos tienen incorporado un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realizó la amplificación.

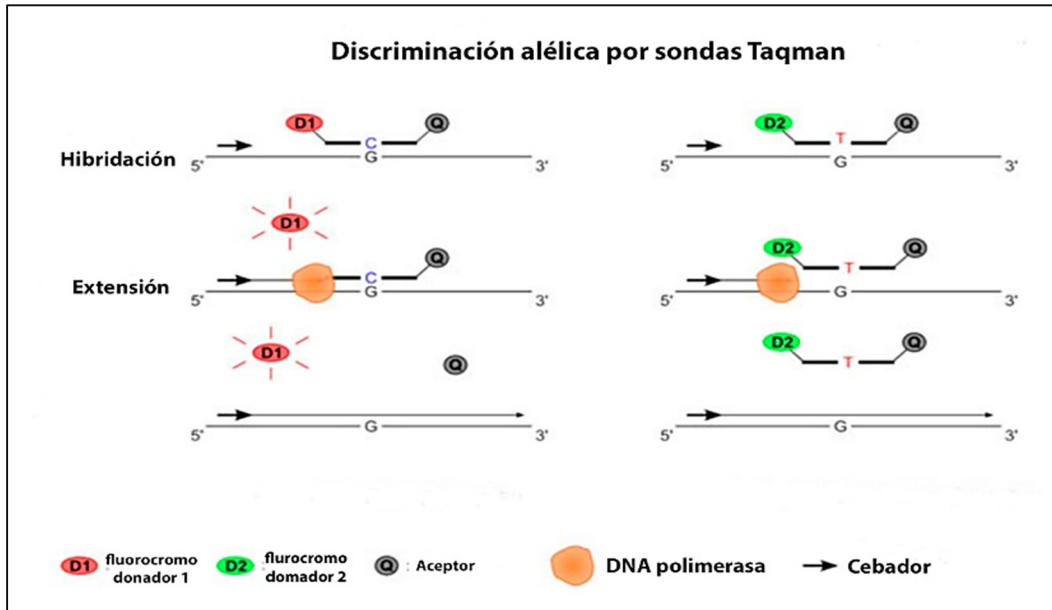


Figura 17. Representación gráfica del mecanismo de acción del ensayo de discriminación alélica por sondas TaqMan™ (130).

La reacción de PCR de discriminación alélica también requiere los mismos componentes que una reacción de PCR convencional (Taq polimerasa, desoxinucleótidos trifosfatos o dNTPs, MgCl<sub>2</sub> y oligonucleótidos sentido y antisentido). En nuestro caso, esta reacción se llevó a cabo con el sistema TaqMan Genotyping Master Mix 2x (Applied Biosystems), en un volumen final de 10 µL, y se realizó en el equipo Step One Plus Real Time PCRTM (Applied Biosystems) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Los polimorfismos analizados mediante esta técnica se detallan en la tabla 6.

Tabla 5. Moléculas fluorescentes utilizadas con sondas TaqMan™

Fluorocromo	Max λabs (nm)	Max λabs (nm)
VIC	538	554
FAM	495	435



Tabla 6. SNPs estudiados en este trabajo de genes relacionados con la autofagia.

GEN	SNP ID	REFERENCIA COMERCIAL	CAMBIO EN EL DNA	CAMBIO EN PROTEÍNA	SONDA VIC	SONDA FAM
ATG2B	rs37599601	C_9690160_20	4512C>GC	p.Q1383E	C	G
ATG5	rs22452	C_3001905_20	C>G (intrón)	-	C	G
ATG10	rs1864183	C_11953871_10	929C>T	p.T212M	C	T
ATG16L1	rs2241880	C_9095577_20	1153A>G	p.T300A	A	G
NOD2	rs2066844	C_117174468_20	2209C>T	p.R702W	C	T
NOD2	rs2066845	C_117174466_20	2829C>G	p.R908G	C	G

Los resultados de este estudio muestran generalmente tres nubes de puntos diferenciados correspondientes al genotipo de cada una de las muestras analizadas (figura 19).

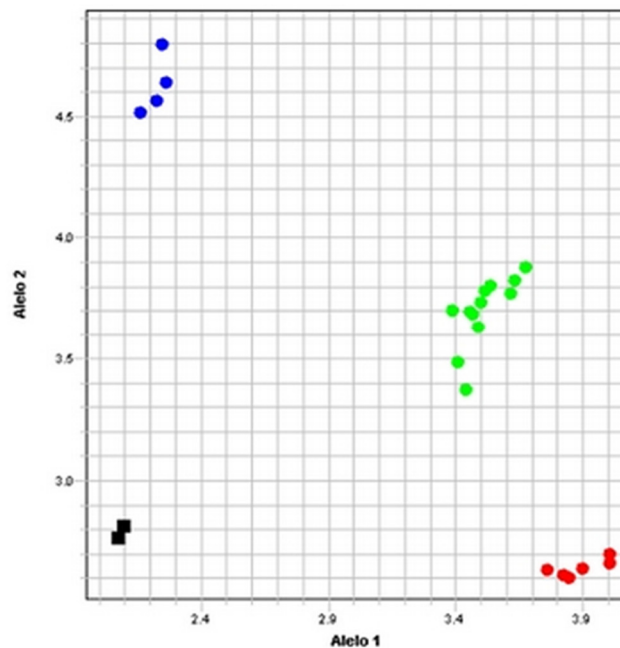


Figura 18. Representación de los resultados de la discriminación alélica con sondas TaqMan™ del polimorfismo del gen ATG5 Rs2245214. En la figura se observa que el eje de las x representa el alelo 1 o C, mientras en el eje de las Y el alelo 2 o G. Al culminar el ensayo la fluorescencia emitida genera la discriminación de los alelos y se representa en la gráfica por nube de puntos donde se observan los genotipos posibles: los azules son homocigotos GG, los verdes son heterocigotos GC y los rojos homocigotos CC.

## 4. LÍNEAS CELULARES TUMORALES

En este trabajo se han utilizado dos líneas de carcinoma colorrectal: HT29 y HCT116. En el caso de línea HT29 fue derivada de un adenocarcinoma (ATCC® HTB-38™), mientras que la línea HCT116 (ATCC® CCL-247™) fue derivada de un carcinoma. Las características de las mismas se detallan en la tabla 6.

Tabla 7. Líneas celulares utilizadas y resumen de sus mutaciones

LÍNEA CELULAR	GENES MUTADOS	MUTACIONES
HT29	APC	c.2557G>T; p.E853* c.4666_4667insA; p.T1556fs*3
	BRAF	c.1799T>A; p.V600E
	PI3KCA	c.1345C>A; p.P449T
	SMAD4	c.931C>T; p.Q311X
	TP53	c.818G>A; p.R273H
HCT116	CDKN2A	c.68_69insG; p.R24fs*20
	CTNNB1	c.133_135delTCT; p.S45del
	KRAS	c.38G>A; p.G13D)
	MLH1	c.755C>A; p.S252*
	PI3KCA	c.3140A>G; p.H1047R

## 5. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES

Todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador (Cultek S.L.U., Madrid, España) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de aire. Para el cultivo se utilizó el medio Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich) con glucosa (4.5 g/L), L-glutamina y L-piruvato. El medio de cultivo se suplementó con suero fetal bovino (FBS) al 10% y antibióticos al 1% (penicilina/estreptomicina) (Invitrogen, Life Technologies, California, Estados Unidos).

En el caso del cultivo de las células bajo condiciones hipóxicas, todas las líneas celulares se cultivaron en un incubador (Cultek S.L.U.) a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 1% de aire.

## 6. FÁRMACOS

En este trabajo se han utilizado 6 fármacos diferentes

- **Cloroquina** (Sigma-Aldrich, Misuri, Estados Unidos): se preparó una solución de 50 mM del fármaco disolviendo la droga en polvo en ddH<sub>2</sub>O al 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se usaron las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 125 µM.
- **Decitabina® (5-aza-2'-desoxicidina)** (Sigma-Aldrich): a partir de un *stock* de 50 µM en ácido acético se prepararon las concentraciones del estudio: 0,5, 1, 2, 3, 6, y 7,5 µM.
- **Deferoxamina (DFO)** (Sigma-Aldrich): se preparó una solución de 76,12 mM del fármaco disolviendo 50 mg de la droga en polvo en 1 mL de ddH<sub>2</sub>O. Se usaron las concentraciones de 200, 250, 300, 350, 400, 450 µM. Este fármaco es un quelante de hierro de alta afinidad que reduce el daño celular mediado por radicales libres y tiene la habilidad de mimetizar la hipoxia (131).
- **Metformina** (Sigma-Aldrich): se preparó disolviendo la pastilla de la casa comercial en 50 mL de ddH<sub>2</sub>O. A partir de ese *stock* se prepararon las concentraciones del estudio: 0,5, 1, 2,5, 5, 6,5 y 8 mM.
- **Panobinostat® (LBH589)** (Novartis Pharmaceuticals, Basilea, Suiza): este compuesto fue proporcionado por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca. Se preparó a partir de un *stock* de 1 mM usando como vehículo DMSO. Fue utilizado a las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150 nM.
- **Taxol® (Paclitaxel)** (Teva Genéricos Española S.L., Madrid, España): a partir de un *stock* de 6 mg/mL se prepararon las concentraciones de 5, 10, 20, 35, 50 y 75 nM.

## 7. CONTAJE DE CÉLULAS

El conteo de células se llevó a cabo utilizando la cámara de Neubauer, aplicando la siguiente fórmula:  $\text{Concentración} = (\text{n}^\circ \text{ de células} \times 10.000) / \text{n}^\circ \text{ de cuadrantes}$ .

Esta técnica fue utilizada para todos los ensayos de viabilidad celular, inmunofluorescencia y ciclo celular.

## 8. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

Para evaluar el crecimiento y la supervivencia celular al tratamiento con los compuestos mencionados anteriormente en las líneas celulares de CCR se realizó el ensayo de viabilidad con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio MTT (132).

Esta técnica consiste en el marcaje de células metabólicamente activas con el MTT (Sigma-Aldrich). Se trata de un compuesto de color amarillento que, al ser reducido por la enzima succinato deshidrogenasa celular (SDH), da lugar a un compuesto hidrofóbico de color azul oscuro, el formazán. Este se solubiliza con DMSO y, posteriormente, se mide la intensidad de color con un espectrofotómetro, lo que permite determinar la tasa de proliferación. La absorbancia se correlaciona con el color e, indirectamente, con la cantidad de células en cultivo metabólicamente activas, por lo que, a mayor color, mayor absorbancia y mayor cantidad de células en cultivo metabólicamente activas.

Para llevar a cabo este ensayo se sembraron 10.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos, dejándolas crecer durante 24 horas. Una vez pasado este tiempo, se reemplazó el medio de cultivo por uno nuevo con diferentes concentraciones del fármaco a evaluar utilizando siempre células sin tratamiento como control de cada tiempo.

Las células se incubaron durante 24, 48 y 72 horas. Además, se utilizó una placa sin ningún tipo de tratamiento (tiempo 0) como control. Una vez transcurridos los tiempos de tratamiento, se añadió a cada pocillo 1 mg/mL de MTT y se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras esto, se eliminó el sobrenadante y se añadió DMSO para solubilizar los cristales de formazán depositados en el pocillo. Por último, se determinó la absorbancia de cada pocillo a 560 nm en un lector de microplacas UltraEvolution (Tecan®, Männedorf, Suiza). En cada experimento se analizaron tres réplicas y se repitió tres veces para verificar los resultados. En este trabajo se desarrollaron diferentes ensayos de viabilidad resumidos en la tabla 7. Es importante destacar que las concentraciones de los fármacos utilizados se especifican en el punto 5.

Tabla 8. Ensayos de MTT realizados.

ENSAYO	CONDICIONES
HIPOXIA	5% CO <sub>2</sub> ; 1% O <sub>2</sub> ; 37°C
NORMOXIA	5% CO <sub>2</sub> ; 95% O <sub>2</sub> ; 37°C
HIPOXIA (DFO)	300; 350, 400, 450; 500 µM
HIPOXIA (DFO) + FÁRMACO	DFO a 300 µM + Panobinostat; Cloroquina; Metformina; Paclitaxel; Decitabina
NORMOXIA + FÁRMACO	Panobinostat; Cloroquina; Metformina; Paclitaxel; Decitabina

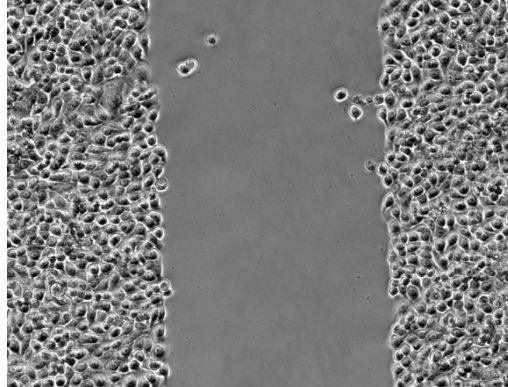
## 9. ENSAYOS DE MIGRACIÓN CELULAR

Los ensayos de cierre de herida permiten mimetizar la migración celular *in vivo* y se basa en la observación de que la creación de un espacio artificial (herida) en un cultivo celular en monocapa confluyente puede promover la migración de las células presentes en el borde del espacio (133). Este método permite determinar la velocidad a la que las células migran cuando se desplazan a través de una herida, *scratch* o región sin células en el soporte en el que están sembradas.

Para evaluar la acción del DFO sobre la capacidad de migración celular de las líneas tumorales HT29 y HCT116, se sembraron 700.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos. Se dejaron crecer durante 24 horas para que estuviesen confluentes. Se les retiró el medio de cultivo y se lavaron con tampón fosfato salino (PBS). Al retirar el PBS, con la ayuda de una punta de micropipeta de 2 µL se practicaron dos *scratches* por pocillo y se añadió medio de cultivo sin ser suplementado con FBS y se agregó mitomicina C a una concentración de 0,01 mg/mL a todos los pocillos. Se tomaron como controles tres pocillos y a los otros tres se les añadió DFO (300 µM). Este ensayo se realizó con el fin de observar la influencia del DFO en la migración celular.

Con la ayuda de una cámara acoplada a un microscopio de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TE-2000-E), se tomaron fotos de tres regiones de cada *scratch*, cada 10 minutos durante 48 horas. Las células se mantuvieron en todo momento en una atmósfera a 37°C, y CO<sub>2</sub> al 5%. Las fotos fueron analizadas a través del programa ImageJ®, verificando la distancia de un lado a otro del *scratch* en

píxeles. Los resultados finales fueron obtenidos a partir de la media de seis experimentos diferentes y se representaron en relación al control no tratado y comparando las líneas celulares utilizadas en presencia de DFO en cada tiempo de incubación.



**Figura 19. Ensayo de cierre de herida o *scratch*.** Microfotografía de las células HT29 confluentes a las que se les practicó el *scratch* en la monocapa.

## 10. CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio del ciclo celular en las líneas HT29 y HCT116 tratadas con paclitaxel a 5 nM se realizó a 24, 48 y 72 horas por citometría de flujo, tomando un tiempo 0 como control. Tras la exposición al compuesto durante el tiempo estipulado, las células se recogieron y se fijaron en etanol al 70% frío. Una vez fijadas, se lavaron varias veces con PBS para eliminar los residuos de etanol, centrifugando a 1.500 r.p.m. durante 3 minutos. Después, se añadió a cada muestra 0,05% de RNAasa A y 7,5  $\mu$ l de yoduro de propidio (Sigma-Aldrich) y los tubos se incubaron a temperatura ambiente toda la noche. Una vez terminada la incubación, las muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences, Nueva Jersey, Estados Unidos) para determinar la distribución del ciclo celular, cuantificando el DNA de un total de 30.000 células por muestra. Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa asociado al citómetro CellQuest Pro® (BD Bioscience). Este programa proporciona un gráfico para cada muestra en el que se representa la cantidad de DNA, proporcional a la cantidad de yoduro de propidio, en abscisas y el número de células en ordenadas. Los archivos obtenidos fueron analizados con el programa WINMDI 2.9., el cual permite hacer una discriminación y cuantificación del número de células en cada estado del ciclo celular. En todos los casos se realizaron tres réplicas de cada experimento para verificar los resultados.

## 11. ANTICUERPOS

En este trabajo se han utilizado nueve anticuerpos primarios, dos anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidasa de rábano (HRP) y dos anticuerpos secundarios unidos a una molécula fluorescente. Todos ellos se detallan en la tabla 8.

Tabla 9. Anticuerpos usados en este trabajo en los experimentos de Western Blot e inmunofluorescencia (IF).

ANTICUERPO	TIPO	ORIGEN	CONCENTRACIÓN		CASA COMERCIAL DE PROTEÍNA (K)	TAMAÑO
			WB	IF		
<b>ANTI-LC3B</b>	Primario	Conejo	1/1.000	1/200	Novus Biologic (NB61384)	17 (LC3B-II) 19 (LC3B-I)
<b>ANTI-P62</b>	Primario	Conejo	1/1.000	1/200	Abcam® (ab109012)	62
<b>ANTI-MTOR</b>	Primario	Conejo	1/1.000	-	Cell Signalling (#2972)	289
<b>ANTI-BECLIN1</b>	Primario	Conejo	1/1.000	-	Cell Signalling (#8678)	60
<b>ANTI-ATG5</b>	Primario	Conejo	1/1.000	-	Cell Signalling (#9474)	55
<b>ANTI-BNIP3</b>	Primario	Conejo	1/1.000	-	Cell Signalling (#664)	22
<b>ANTI-PARP</b>	Primario	Conejo	1/500	-	Cell Signalling (#142)	89
<b>ANTI-HIF-1A</b>	Primario	Conejo	1/500	1/100	Abcam® (ab113642)	93
<b>ANTI-BACTINA</b>	Primario	Conejo	1/10.000	-	Sigma-Aldrich	42
<b>ANTI-MOUSE (HRP)</b>	Secundario	Cabra	1/10.000	-	Millipore (AP30)	
<b>ANTI-RABBIT (HRP)</b>	Secundario	Cabra	1/10.000	-	GE Healthcare (NXA93)	
<b>ANTI-RABBIT (ALEXA®594)</b>	Secundario	Cabra	-	1/400	Molecular Probes® Invitrogen™ (A11037)	
<b>ANTI-MOUSE (ALEXA® 488)</b>	Secundario	Burro	-	1/400	Molecular Probes® Invitrogen™ (A21202)	

## 12. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para realizar la extracción de proteínas a partir de líneas celulares, el material donde se cultivaron las células al igual que todos los reactivos se mantuvieron en hielo para evitar su degradación.

A las placas de cultivo se les retiró el medio que contenía y se lavaron con PBS 1X Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Tras ello, se les retiró el PBS y se les añadió tampón de lisis frío (NaCl 140 mM, EDTA 10 mM, 10% glicerina, 1% Nonidet P-40, Tris 20 mM pH 8,0) que contenía los siguientes inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, pepstatina 1  $\mu$ M, aprotinina 1  $\mu$ g/mL, leupeptina 1  $\mu$ g/mL y ortovanadato sódico 1 mM. Luego se realizó la recogida de células utilizando el raspador o *scraper*, y todo el material obtenido se añadió a un tubo. Este tubo se dejó reposar por 10 minutos y se centrifugó a 4°C a 13.000 r.p.m. durante 15 minutos. Posteriormente el sobrenadante obtenido se añade a otro tubo.

Tras obtener todos los extractos se procedió a realizar la medición de la concentración proteica usando el Nanodrop. Los extractos fueron almacenados en un congelador a -80°C para su posterior uso.

## 13. WESTERN BLOT

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en condiciones reductoras en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) siguiendo el protocolo descrito por Laemmli (134).

Para realizar la electroforesis, se prepararon geles de poliacrilamida al 8% para las proteínas con un peso molecular mayor o en torno a 60 kDa (HIF-1 $\alpha$ , Beclin1, mTOR, PARP y p62) y al 12% para las proteínas con un peso menor a 60 kDa (ATG5, BNIP3 y LC3B). Encima del gel separador, se preparó un gel concentrado al 4% acrilamida/bis acrilamida 30% en tampón Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y SDS al 10% con la finalidad de lograr que todos los extractos proteicos penetraran el gel separador a la vez. Para la polimerización de los geles se utilizó AMPS (persulfato de amonio) y TEMED (N, N, N',N'-tetrametiletildiamina). Posteriormente, se procedió a la preparación de las muestras mezclando 200  $\mu$ g de cada extracto proteico con tampón de carga (4% SDS, 0,05% azul de bromofenol, 20% glicerina, 2%  $\beta$ -mercaptoetanol, Tris 100 mM pH 6,8). Una vez preparadas, se desnaturalizaron durante 5-10 minutos a 95-100 °C en un baño seco. Tras esto, se procedió a la carga de las muestras en geles de poliacrilamida para su separación en función del tamaño mediante electroforesis vertical con minigeles discontinuos. La electroforesis se realizó en cubetas MiniPROTEAN®3 (BioRad, Hércules, CA, Estados Unidos) a voltaje constante de 150 voltios en condiciones desnaturalizantes en tampón de electroforesis (Tris 20 mM, glicina 192 mM y 1% SDS), usando como marcador de peso molecular PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific).



Tras finalizar la electroforesis, las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore Corporation, Massachusetts, Estados Unidos) mediante un sistema de transferencia semiseco (Trans-Blot Turbo, BioRad. CA, USA) a 25 voltios constantes en ambiente húmedo de tampón (Tris 20 mM, pH 8,3; glicina 192 Mm y 20% metanol) durante 30 minutos. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante 1 hora con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (*Tris buffered saline with Tween*, 0,1 % tween-20) para saturar todos los sitios inespecíficos de unión a proteínas. A continuación, la membrana se incubó con el anticuerpo primario específico para la proteína de interés a la dilución adecuada (tabla 8) en TBS-T con BSA (*Bovine Serum Albumin*, Sigma-Aldrich) al 3% toda la noche a 4°C. Tras varios lavados con TBS-T en agitación, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Tras nuevos lavados de la membrana con TBS-T, se utilizó el sistema de quimioluminiscencia basado en la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), según las especificaciones del fabricante, y se expuso la membrana a películas fotosensibles de autorradiografía (FUJIFILM, Tokio, Japón) para la detección de proteínas.

La cuantificación de la señal del Western blot se llevó a cabo mediante el el programa de análisis de imagen ImageJ®. La expresión relativa de proteínas se normalizó utilizando la expresión de los controles de carga ( $\beta$ -actina). La cuantificación se expresó como porcentaje de los niveles de expresión en células controles, que fueron arbitrariamente seleccionadas como el 100%.

## **14. INMUNOFLUORESCENCIA**

Para observar la distribución celular y la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$ , LC3B y p62 en las células tumorales tratadas con los diferentes fármacos se realizaron experimentos de inmunofluorescencia (tabla 8).

Para llevar a cabo esta técnica se sembraron 400.000 células de las líneas tumorales HT29 y HCT116 en placas de 6 pocillos con 3 cristales circulares de 12 mm de diámetro. Se dejaron crecer durante toda la noche. Tras haber crecido, se les realizó un lavado con PBS y luego se les agregó a a todos los pocillos medio DMEN suplementado con 10% FBS y 1% penicilina/estrectomicina y exclusivamente a 3 pocillos el fármaco de estudio. El tiempo de incubación con el fármaco y la concentración de los mismos fue variable, estos se resumen en la tabla 9.

Tabla 7. Resumen de los ensayos de inmunofluorescencia.

ENSAYO	CONCENTRACIÓN DEL FÁRMACO DE INTERÉS	DURACIÓN (HORAS)
DFO	300µM	1, 4, 8 y 24
DFO + DECITABINA	300 µM+ 6 µM	72
DFO + METFORMINA	300 µM+ 8 mM	72
DFO + CLOROQUINA	300 µM+ 25 µM	72
DFO + PANABINOSTAT	300 µM+ 50 nM	72
DFO + PACLITAXEL	300 µM+ 5n M	72

Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron las células con PBS para eliminar el medio de cultivo y se fijaron con 1 mL/pocillo de formaldehído al 37% diluido en PBS durante 10 minutos en hielo. Se eliminó el formaldehído y se procedió a lavar los pocillos tres veces cada 5 minutos con PBS, tras lo cual las células se permeabilizaron añadiendo 1 mL/pocillo de Tritón-X-100 (IBI Scientific, Peosta Estados Unidos) al 0,5% durante 10 minutos en hielo. Tras lavar con PBS se añadió a cada pocillo 2 mL de solución de bloqueo preparada con BSA al 10% en PBS y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los cristales cubreobjetos se trasladaron a cámaras húmedas y se añadió a cada uno 30 µL de anticuerpo primario preparado con BSA al 3% en PBS usando las concentraciones especificadas en la tabla 8. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente y atmósfera húmeda durante hora y media. Seguidamente, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con 30 µL de anticuerpo secundario preparado en BSA al 1% de PBS en las cámaras húmedas durante una hora y media y en oscuridad. Tras ello, se lavaron de nuevo con PBS tres veces y se incubaron 10 minutos con el intercalador 4',6-diamino-2-fenilindo (DAPI) (Roche, Basilea, Suiza) para la tinción de los núcleos celulares ya que esta molécula se une a regiones enriquecidas en adenina y timina del DNA (135). La dilución utilizada para el DAPI en los ensayos realizados fue 1:2000 (en ddH<sub>2</sub>O). Por último, se lavaron las células 3 veces con PBS y se colocó cada cubreobjetos sobre un portaobjetos usando la solución Moviol (Sigma-Aldrich) que actúa como pegamento. Posteriormente, los portaobjetos se guardaron en oscuridad a 4°C. Una vez seco el pegamento, las células se visualizaron en un microscopio confocal LEICA SP5 modelo DMI 6000B con el software asociado LEICA LAS AF y se obtuvieron las imágenes con una cámara conectada a dicho microscopio.

## 15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos en los distintos experimentos se analizaron usando el software IBM SPSS Statistics 23.0.0. En los estudios de asociación de polimorfismos se analizó la distribución de genotipos entre pacientes y controles mediante el test  $\chi^2$  de Pearson. En aquellos polimorfismos en los que encontramos diferencias estadísticamente significativas, se estimaron los Odd ratios (ORs) e intervalos de confianza del 95% para cada variante usando modelos de regresión logística.

Para determinar si existían diferencias significativas de la expresión de proteínas en líneas tumorales de CCR en los distintos ensayos se realizó un análisis estadístico comparativo utilizando la distribución T-Student. Utilizando el mismo análisis, se compararon los resultados obtenidos a partir del ensayo de migración celular.

Los datos del estudio del ciclo celular se analizaron comparando las medias de tres experimentos independientes (fármaco/control) mediante ANOVA de un factor para cada una de las fases. En todos los casos se consideró estadísticamente significativo un  $p$ -valor  $< 0,05$ .



## 1. ANALISIS DE POLIMORFISMOS RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON CCR

Las variantes polimórficas de un gen pueden modificar la expresión de una proteína. Esto se debe a que estas mutaciones pueden afectar la expresión, estructura y transcripción del gen o el procesamiento del RNA (136).

Para evaluar si cambios polimórficos en genes relacionados con la autofagia se asocian a cambios en la susceptibilidad al desarrollo de CCR, hemos analizado una población de 468 pacientes, 332 diagnosticados de CCR esporádico, 103 con sospecha de SL y 33 individuos con sospecha de PAF. Como población control seleccionamos 264 individuos (58,7% hombres y 41,3% mujeres) mayores de 60 años que no tuvieran ningún antecedente personal o familiar de cáncer. El porcentaje de hombres y mujeres fue similar tanto en pacientes como en controles para evitar un sesgo en los resultados debido al sexo.

En este trabajo hemos estudiado seis polimorfismos de genes relacionados con la autofagia mediante la técnica de discriminación alélica con sondas TaqMan™. La distribución de los genotipos en cada uno de los polimorfismos analizados en el grupo control cumplía el equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,1$ ).

La distribución de genotipos y alelos entre los grupos de pacientes y controles se comparó para analizar una posible relación entre el genotipo y la susceptibilidad a padecer CCR.

Los resultados obtenidos para el grupo diagnosticado con PAF se muestran en la tabla 10.

**Tabla 8. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con PAF y su asociación con el riesgo a padecer CCR.**

SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor
ATG2B	CC	4 (12,12%)	39 (14,77%)	0,779
	CG	12 (36,36%)	115 (43,56%)	
rs3759601 Gln1383Glu	GG	17 (51,51%)	110 (41,66%)	0,621
	CC+GG	21 (63,63%)	154 (58,3%)	
	GG	17 (51,51%)	110 (41,66%)	
	CC	4 (12,12%)	39 (14,77%)	0,532
	CG+GG	29 (87,87%)	225 (85,22%)	
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CC	12(36,36%)	106 (40,15%)	0,823
	CG	15 (45,45%)	127 (48,10%)	
	GG	6 (18,18%)	31 (11,74%)	0,765
	CC+GG	18 (54,54%)	223 (84,47%)	
	GG	6 (18,18%)	31 (11,74%)	
	CC	12 (36,36%)	106 (18,75%)	0,643
CG+GG	21 (63,63%)	158 (59,84%)		
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	8 (24,24%)	68 (25,75%)	0,923
	CT	18 (54,54%)	151 (57,19%)	
	TT	7 (21,21%)	45 (17,04%)	0,865
	CC+CT	24 (72,72%)	219 (82,95%)	
	TT	7 (21,21%)	45 (17,04%)	
	CC	8 (24,24%)	68 (25,75%)	0,798
	CT+TT	15 (45,45%)	196 (74,24%)	
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG	13 (39,39%)	63 (23,86%)	0,933
	GA	11 (33,33%)	138 (52,27)	
	AA	7 (21,21%)	63 (23,86%)	0,814
	GG+GA	24 (72,72%)	201 (76,14%)	
	AA	7 (21,21%)	63 (23,86%)	
	GG	13 (39,39%)	63 (23,86%)	0,793
	GA+AA	18 (54,54%)	201 (76,14%)	
NOD2 rs2066844	CC	28 (84,84%)	167 (63,25%)	0,823
	CT	2 (6,06%)	21 (7,95%)	
	TT	1 (3,03%)	1 (0,38%)	0,965
	CC+CT	30 (90,91%)	188 (71,21)	
	TT	1 (3,03%)	1 (0,38%)	
	CC	28 (84,84%)	167 (63,25%)	0,67
	CT+TT	3 (9,091%)	22 (8,3%)	
NOD2 rs2066845	GG	30 (90,91%)	100 (37,87%)	0,312
	GC	3 (9,091%)	1 (0,38%)	
	CC	-	-	0,312
	GG+GC	33 (100%)	101 (38,25%)	
	CC	-	-	
	GG	30 (90,91%)	100 (37,87%)	0,312
	GC+CC	3 (9,091%)	1 (0,38%)	

En el caso de los resultados para el grupo de pacientes diagnosticado con SL se muestran en la tabla 11.

**Tabla 9. Frecuencias genotípicas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con SL y su asociación con el riesgo a padecer CCR.**

SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor
ATG2B rs3759601 Gln1383Glu	CC	35 (33,98%)	39 (14,77%)	0,623
	CG	41 (39,80%)	115 (43,56%)	
	GG	27 (26,21%)	110 (41,66%)	
	CC+GG	62 (60,19%)	154 (58,3%)	
	GG	27 (26,21%)	110 (41,66%)	
	CG+GG	68 (66,02%)	225 (85,22%)	
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CC	41 (39,80%)	106 (40,15%)	0,945
	CG	45 (43,69%)	127 (48,10%)	
	GG	17 (16,50%)	31 (11,74%)	
	CC+GG	58 (56,31%)	223 (84,47%)	
	GG	17 (16,50%)	31 (11,74%)	
	CG+GG	62 (60,19%)	158 (59,84%)	
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	31 (30,09%)	68 (25,75%)	0,734
	CT	45 (43,69%)	151 (57,19%)	
	TT	24 (23,30%)	45 (17,04%)	
	CC+CT	76 (73,78%)	219 (82,95%)	
	TT	24 (23,30%)	45 (17,04%)	
	CT+TT	48 (46,60%)	196 (74,24%)	
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG	32 (31,07%)	63 (23,86%)	0,923
	GA	46 (44,66%)	138 (52,27)	
	AA	25 (24,27%)	63 (23,86%)	
	GG+GA	78 (75,73%)	201 (76,14%)	
	AA	25 (24,27%)	63 (23,86%)	
	GA+AA	71 (68,93%)	201 (76,14%)	
NOD2 rs2066844	CC	96 (93,20%)	167 (63,25%)	0,823
	CT	6 (5,82%)	21 (7,95%)	
	TT	1 (0,97%)	1 (0,38%)	
	CC+CT	102 (99,03%)	188 (71,21)	
	TT	1 (0,97%)	1 (0,38%)	
	CT+TT	7 (6,80%)	22 (8,3%)	
NOD2 rs2066845	GG	57 (55,24%)	100 (37,87%)	0,390
	GC	36 (34,95%)	1 (0,38%)	
	CC	10 (9,71%)	-	
	GG+GC	93 (90,29%)	101 (38,25%)	
	CC	10 (9,71%)	-	
	GC+CC	46 (44,66%)	1 (0,38%)	

Por último, los resultados de los pacientes diagnosticados CCR esporádico en la tabla 12.

**Tabla 10. Frecuencias genóticas de los polimorfismos en genes relacionados con la autofagia de controles y pacientes diagnosticados con CCR esporádico y su asociación con el riesgo a padecer CCR.**

SNP	Genotipo	Pacientes	Controles	p-valor
ATG2B rs3759601 Gln1383Glu	CC	50 (48,43%)	39 (14,77%)	0,733
	CG	150 (145,63%)	115 (43,56%)	
	GG	132 (39,76%)	110 (41,66%)	0,625
	CC+GG	182 (54,82%)	154 (58,3%)	
	GG	132 (39,76%)	110 (41,66%)	
	CC	50 (48,43%)	39 (14,77%)	
	CG+GG	282 (84,94%)	225 (85,22%)	0,517
ATG5 rs2245214 Cambio intrónico	CC	115 (34,64%)	106 (40,15%)	0,923
	CG	170 (51,20%)	127 (48,10%)	
	GG	47 (14,16%)	31 (11,74%)	0,865
	CC+GG	162 (48,79%)	223 (84,47%)	
	GG	47 (14,16%)	31 (11,74%)	
	CC	115 (34,64%)	106 (18,75%)	
	CG+GG	217 (65,36%)	158 (59,84%)	0,837
ATG10 rs1864183 Thr212Met	CC	75 (22,59%)	68 (25,75%)	0,123
	CT	209 (62,95%)	151 (57,19%)	
	TT	48 (14,46%)	45 (17,04%)	0,925
	CC+CT	284 (85,54%)	219 (82,95%)	
	TT	48 (14,46%)	45 (17,04%)	
	CC	75 (22,59%)	68 (25,75%)	
	CT+TT	257 (77,41%)	196 (74,24%)	0,897
ATG16L1 rs2241880 Thr300Ala	GG	88 (26,51%)	63 (23,86%)	0,123
	GA	180 (54,22%)	138 (52,27)	
	AA	64 (19,28%)	63 (23,86%)	0,975
	GG+GA	260 (78,31%)	201 (76,14%)	
	AA	64 (19,28%)	63 (23,86%)	
	GG	88 (26,51%)	63 (23,86%)	
	GA+AA	244 (79,49%)	201 (76,14%)	0,867
NOD2 rs2066844	CC	304 (91,57%)	167 (63,25%)	0,623
	CT	27 (8,13%)	21 (7,95%)	
	TT	1 (0,30%)	1 (0,38%)	0,565
	CC+CT	331 (99,70%)	188 (71,21)	
	TT	1 (0,30%)	1 (0,38%)	
	CC	304 (91,57%)	167 (63,25%)	
	CT+TT	28 (8,43%)	22 (8,3%)	0,667
NOD2 rs2066845	GG	329 (99,09%)	100 (37,87%)	0,367
	GC	3 (0,90%)	1 (0,38%)	
	CC	-	-	0,367
	GG+GC	332 (100%)	101 (38,25%)	
	CC	-	-	
	GG	329 (99,09%)	100 (37,87%)	
	GC+CC	3 (0,90%)	1 (0,38%)	



Al realizar el análisis de distribución de los genotipos de todos los polimorfismos evaluados en este estudio en los diferentes grupos de pacientes no mostraron diferencias significativas. Por lo cual, los polimorfismos evaluados en este trabajo no confieren susceptibilidad a desarrollar PAF, SL y CCR esporádico.

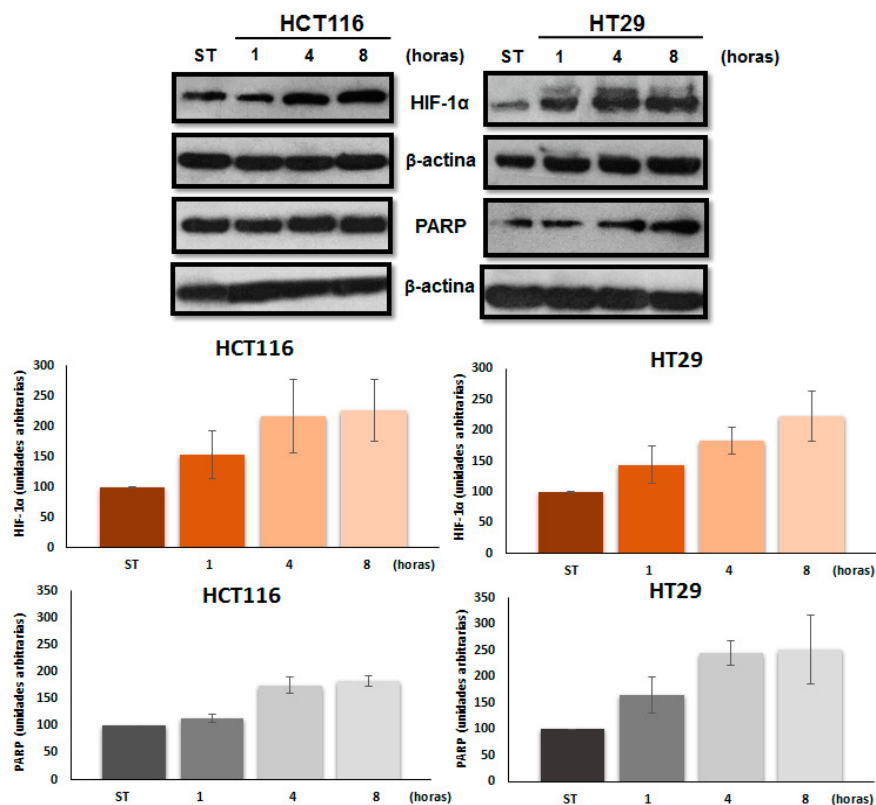
## **2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A CONDICIONES HIPÓXICAS EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES COLORRECTALES**

El crecimiento tumoral genera un microambiente de hipoxia. Para evitar la muerte celular se activan diferentes rutas de señalización. Algunas de estas vías son activadas por la proteína HIF-1 $\alpha$ . Se conoce que a menores concentraciones de oxígeno ocurre la estabilización y activación de esta proteína que puede conllevar a la supervivencia y proliferación de las células (67).

### **2.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA.**

Para observar si la disminución de la concentración de oxígeno generaba la estabilización y aumento de la proteína HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares HCT116 y HT29 se realizaron diferentes ensayos exponiendo los cultivos a una concentración de 1% de oxígeno durante cortos períodos de tiempo (1, 4 y 8 horas). Posteriormente se evaluó la expresión de la proteína PARP con el fin de observar si ocurría muerte celular por la exposición a estas condiciones.

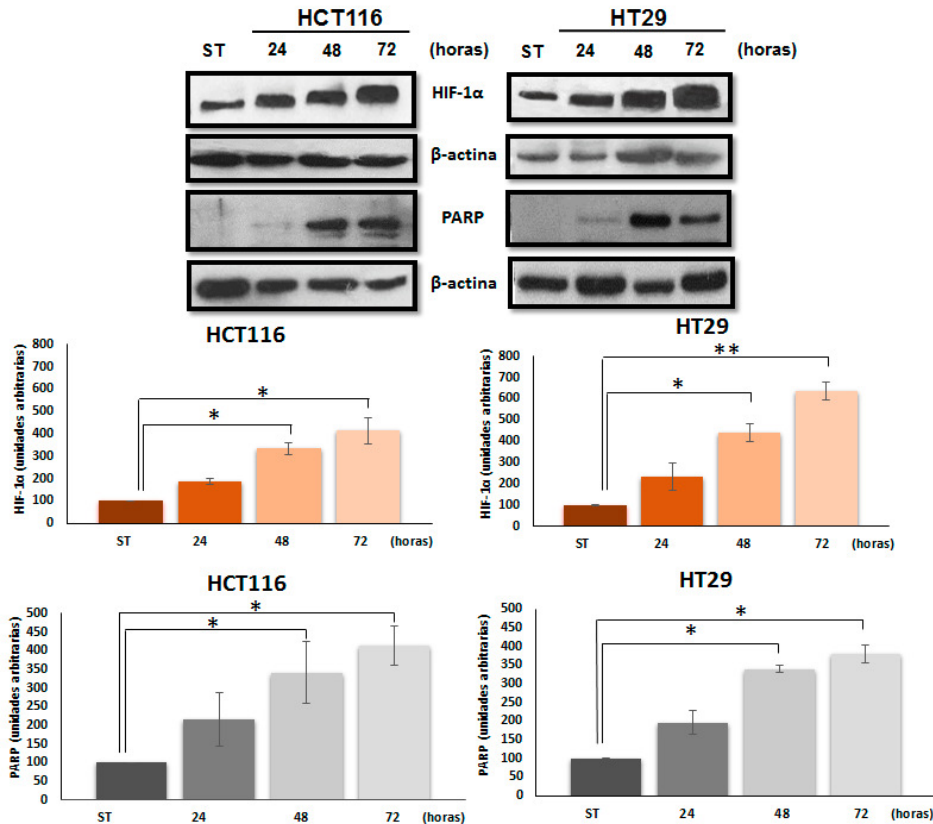
La expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y PARP ha sido observada por western blot y los resultados obtenidos se muestran en la figura 21.



**Figura 20. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al exponer a las líneas celulares a 1, 4 y 8 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

El incremento de la proteína HIF-1α es dependiente del tiempo de exposición a hipoxia en ambas líneas celulares. Sin embargo, al cuantificar la expresión esta no fue estadísticamente significativa. En el caso de la expresión de PARP se pudo observar que en ambas líneas celulares la expresión de esta proteína incrementa con el tiempo de exposición a este tipo de estrés, siendo más evidente en las líneas HCT116. Al cuantificar la expresión el incremento observado no fue estadísticamente significativo.

Debido a que no se obtuvo un efecto representativo en la muerte celular de las líneas tumorales al ser expuestas a corto períodos de hipoxia, se incrementó el tiempo de exposición y se evaluó la expresión de las dos proteínas anteriores.



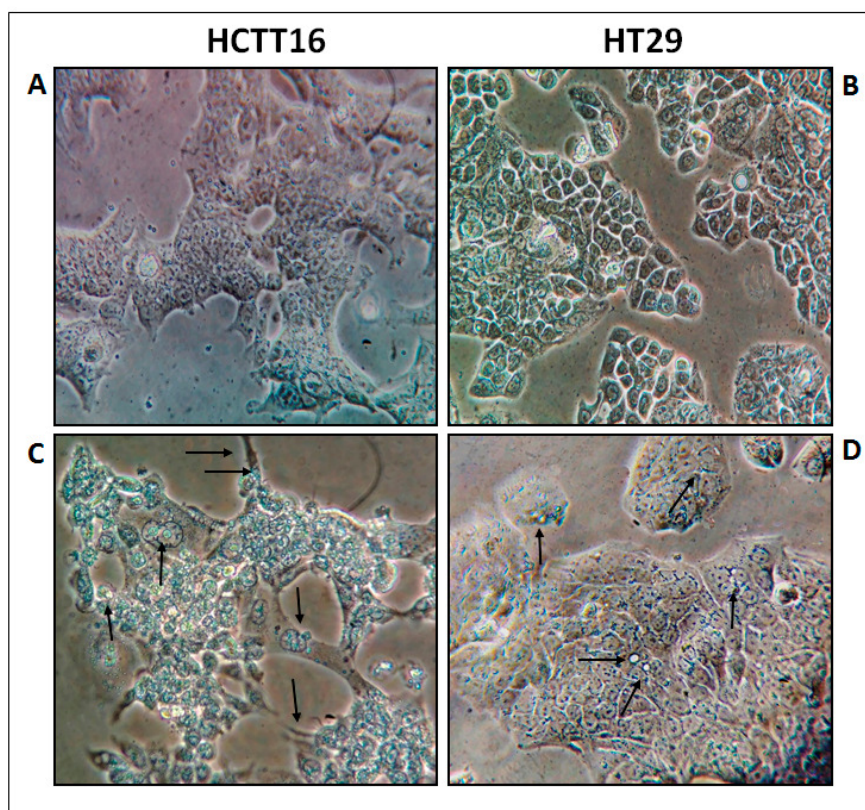
**Figura 21. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

La figura 21 muestra el incremento de la expresión en la proteína HIF-1α con respecto al tiempo en que las líneas tumorales se sometieron a condiciones de hipoxia. Además, la cuantificación de la expresión mostró que, tras 48 horas de exposición, el incremento fue estadísticamente significativo en las dos líneas celulares en comparación con el control (ST). Es importante destacar que el aumento de la expresión de HIF-1α en la línea tumoral HT29 es aún mayor al pasar 72 horas en hipoxia comparado con la línea HCT116 (figura 21).

Por su parte, la expresión de PARP aumentó significativamente tras 48 horas de exposición en las dos líneas tumorales (figura 21).

Además, se analizaron cambios en la morfología celular después de exponer 72 horas a los cultivos celulares a hipoxia. Para ello se tomaron imágenes con un microscopio óptico tanto de las células expuestas a este tipo de estrés como a las que permanecieron el mismo tiempo en condiciones de normoxia y se compararon.

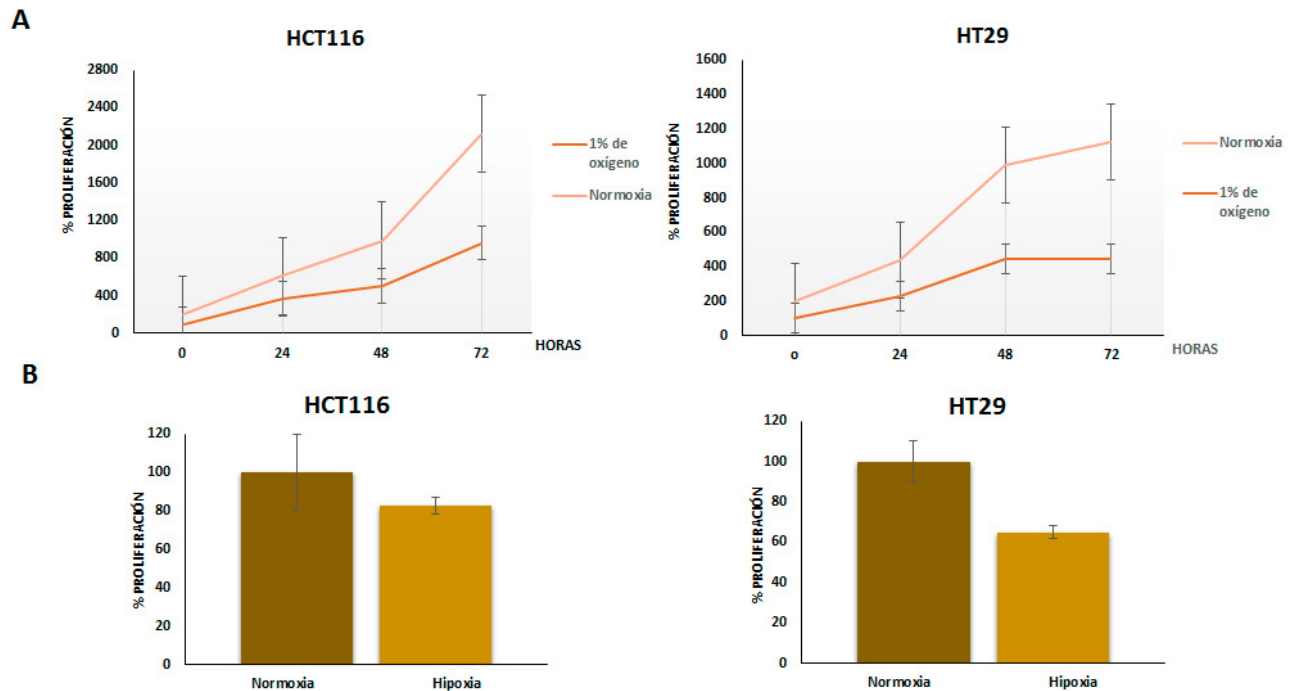
Como se observa en la figura 22, las dos líneas celulares cultivadas bajo una concentración de oxígeno menor presentaron mayor extensión del citoplasma e incremento del número de vesículas, comparadas con las imágenes obtenidas a partir de cultivos en normoxia. En el caso de la línea HCT116 (figura 22C) se observó que la morfología tenía similitud a la de los fibroblastos y en algunos casos se diferenció la presencia de dos núcleos por células (figura 22A). Por otra parte, en la figura 22D se puede observar que la línea celular HT29 presentó extensión de su citoplasma, lo que no se aprecia en los cultivos en normoxia, ya que esta línea presenta una morfología redondeada parecida a los hexágonos (figura 22B).



**Figura 22. Células tumorales derivadas de CCR bajo condiciones de hipoxia (1% de oxígeno).** **A)** cultivos de células HCT116 en condiciones normales. **B)** cultivos de células HT29 en condiciones normales. **C)** cultivos de células HCT116 sometidas a 72 horas a una concentración de 1% de oxígeno. **D)** Cultivos de células HT29 sometidas a 72 horas a una concentración de 1% de oxígeno. La fotografía muestra una imagen representativa obtenida a través de microscopía óptica. Se indica con flechas negras la presencia de células con mayor cantidad de vesículas.

Posteriormente se realizaron diferentes ensayos de viabilidad con las líneas HCT116 y HT29 durante 72 horas con la finalidad de observar si generaba un efecto en el crecimiento y la supervivencia celular.

En la figura 23 se puede observar que en las dos líneas tumorales ocurrió una disminución de la proliferación celular dependiente del tiempo de exposición a hipoxia. Sin embargo, la disminución del crecimiento observada en estos ensayos no fue estadísticamente significativa (figura 23B).



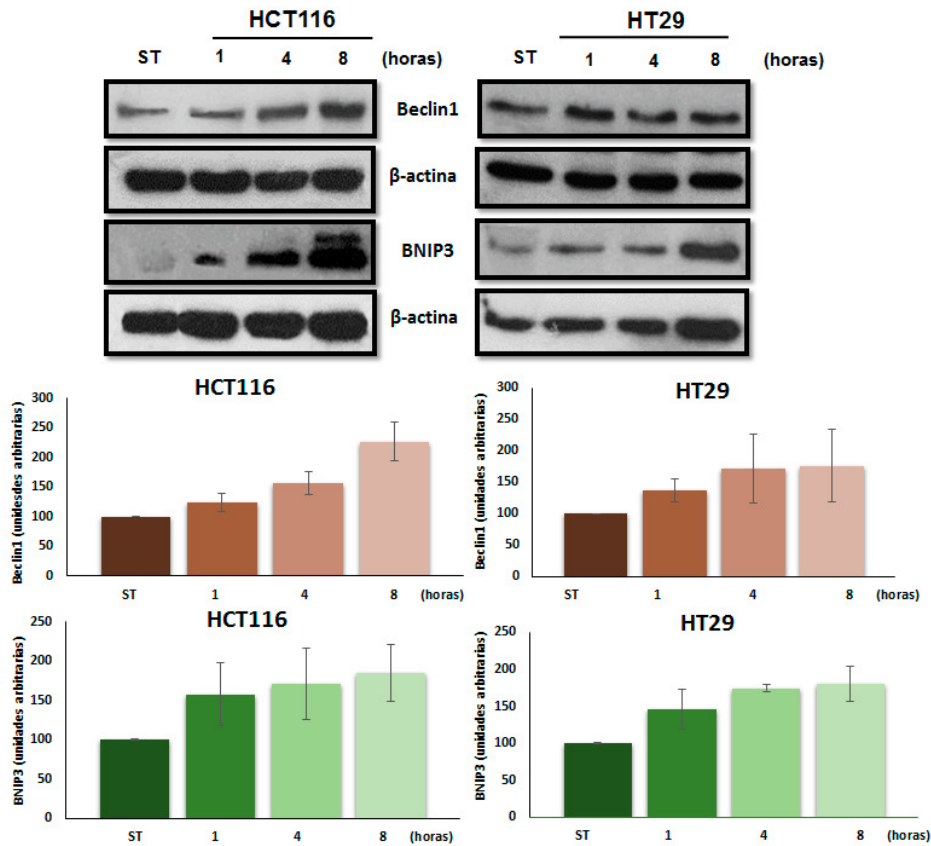
**Figura 23. Proliferación celular de líneas tumorales expuestas a hipoxia. A)** Análisis de la proliferación de líneas celulares de CCR mediante ensayo MTT durante 72 horas. **B)** Comparación de proliferación celular en condiciones normales e hipóxicas en líneas celulares provenientes de CCR al culminar el ensayo.

## 2.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Como se ha mencionado previamente, la hipoxia induce la transcripción de genes que conllevan a la alteración de diferentes rutas metabólicas que permiten la supervivencia celular, siendo una de ellas la autofagia (137). Con el fin de analizar si ocurría un cambio en el proceso autofágico en las líneas celulares de CCR expuestas a cortos períodos de hipoxia se estudió la expresión de proteínas que intervienen en este proceso.

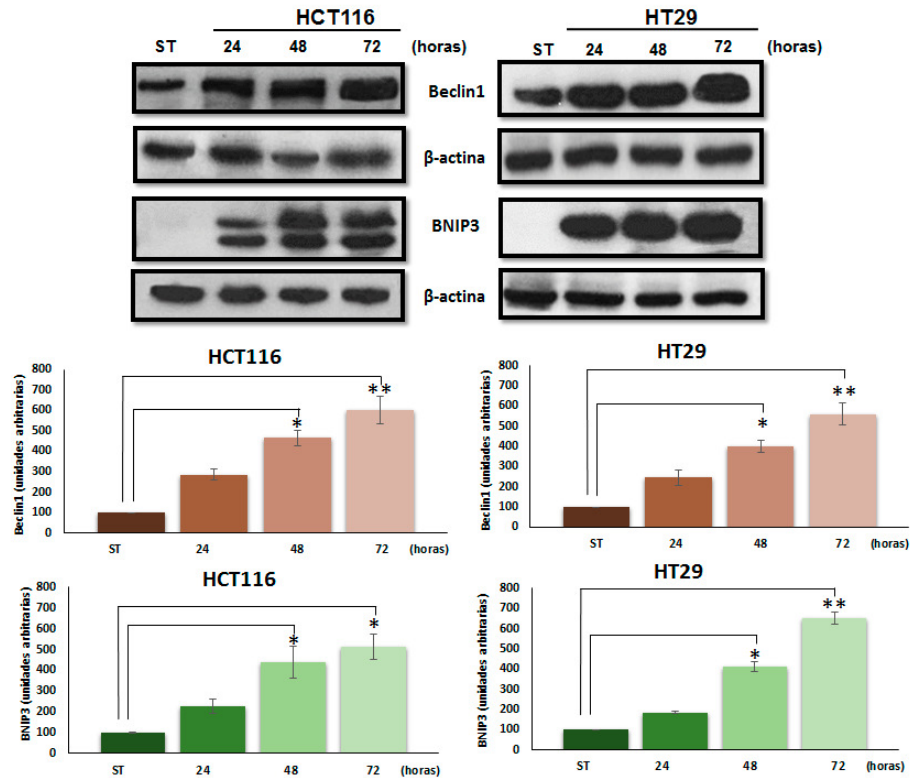
En primer lugar, se analizó la expresión de las proteínas BNIP3 y Beclin1, que intervienen en la activación de la autofagia generada por la hipoxia. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de Beclin1 y BNIP3 en las dos líneas celulares aumenta conforme se extiende la exposición hipóxica

(figura 24). Sin embargo, al cuantificar los resultados obtenidos, el aumento de la expresión de estas dos proteínas no fue estadísticamente significativo (figura 24).



**Figura 24. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 al pasar los cultivos 1, 4 y 8 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observan los valores de la cuantificación de la expresión de las proteínas dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

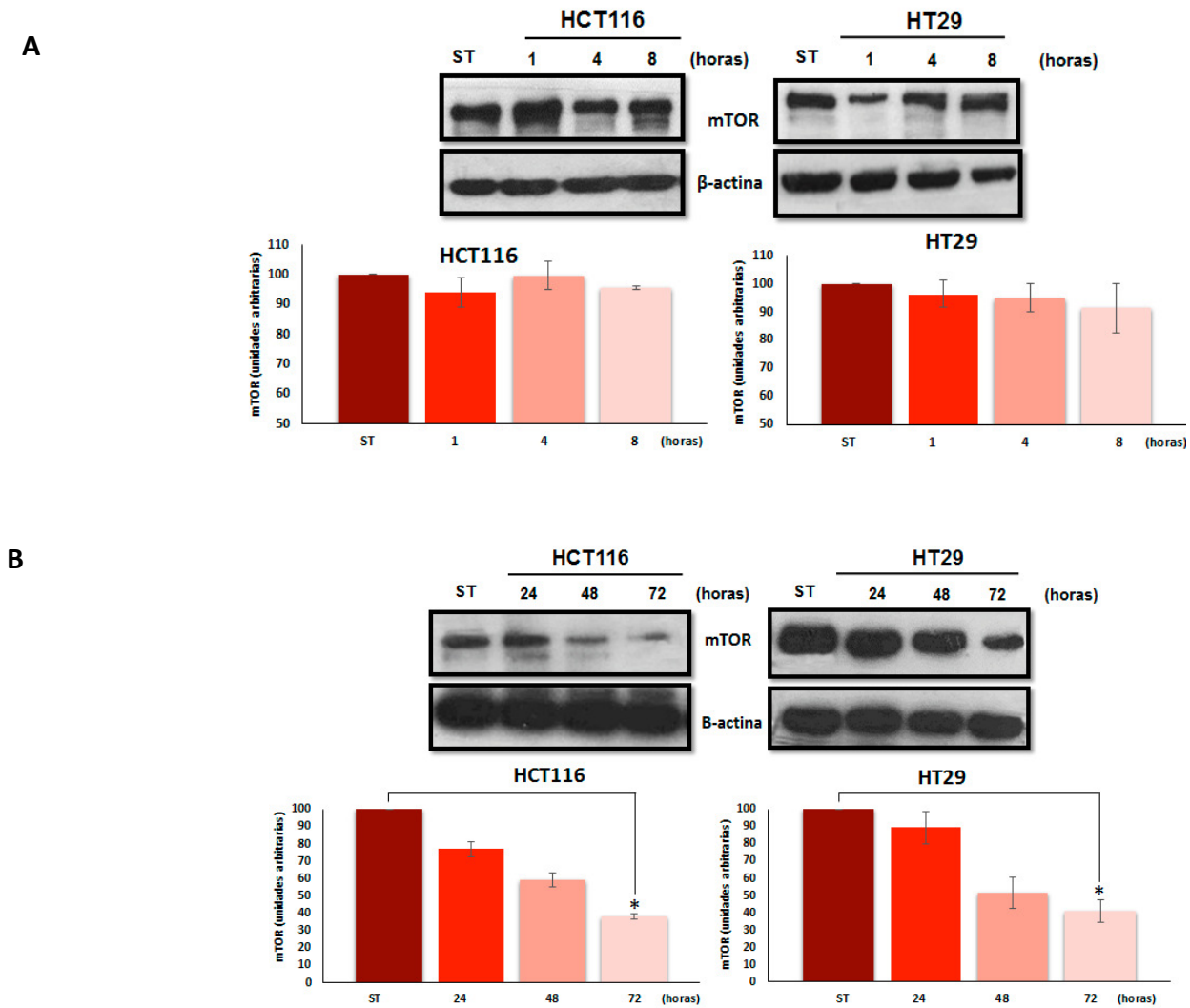
Al ampliar el tiempo de exposición a menor concentración de oxígeno se pudo evidenciar que la expresión de las proteínas BNIP3 y Beclin1 en las dos líneas celulares presentaba un aumento significativo a partir de las 48 horas (figura 25). Al pasar las 72 horas los niveles de expresión de la proteína Beclin1 aumentaron de forma significativa en la línea tumoral HT29, mientras que en la línea HCT116 no ocurrió (figura 25).



**Figura 25. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 a 24, 48 y 72 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. En las gráficas se observan los valores de la cuantificación de la expresión de las proteínas dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se evaluó la expresión de la proteína mTOR, debido a que es una de las moléculas primordiales que permite la activación del proceso autofágico.

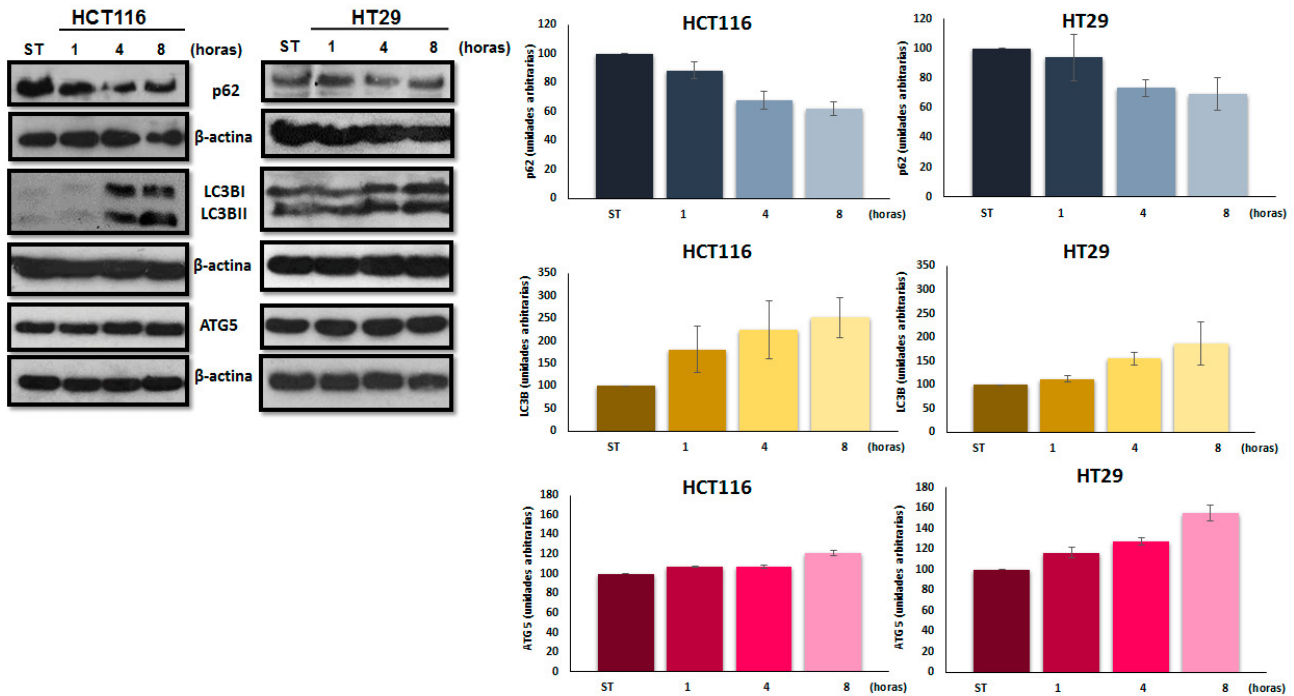
Al analizar los resultados se observó que la expresión de mTOR no se ve afectada al exponer las células a cortos períodos de hipoxia. (figura 26A). Sin embargo, al aumentar el tiempo de exposición a este tipo de estrés la expresión de esta proteína empieza a disminuir en las dos líneas tumorales a partir de las 48 horas (figura 28). Al cuantificar su expresión se pudo observar que en ambas líneas celulares la disminución fue estadísticamente significativa al transcurrir las 72 horas en hipoxia (figura 26B).



**Figura 26. Expresión de la proteína mTOR. A)** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR a partir de extracciones proteicas de cultivos celulares expuestos durante 1, 4 y 8 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. En las gráficas se observan los valores de la cuantificación de la expresión de las proteínas dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST). **B)** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR a partir de extracciones proteicas de cultivos celulares expuestos a 24, 48 y 72 horas bajo condiciones de 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. En las gráficas se observan los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Además, se analizó la expresión de p62, LC3BI/II y ATG5, las cuales también intervienen en el proceso de autofagia.





**Figura 27. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5 a partir de extracciones proteicas de cultivos expuestos a 1, 4 y 8 horas en 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa la cuantificación de la expresión de las proteínas anteriores. Los valores del gráfico indican el promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0.01$  vs control (ST).

En la figura 27 se puede apreciar que la expresión de la proteína p62 disminuyó de forma dependiente al tiempo en hipoxia en las dos líneas celulares. Sin embargo, no fue estadísticamente significativa en ninguno de los casos.

El estudio de LC3B permitió detectar tanto la forma LC3B-I como la forma conjugada con fosfatidiletanolamida (PE), LC3B-II. A pesar de que esta última tiene mayor peso molecular, migra más rápido en SDS-PAGE debido a su hidrofobicidad, por lo que muestra un peso molecular aparentemente más bajo. Al analizar los resultados obtenidos se observó que en la línea celular HCT116 el incremento en la expresión de estas dos isoformas fue a partir de las 8 horas, mientras que en la línea HT29 el aumento no fue tan evidente. Al cuantificar la expresión se pudo apreciar que el incremento observado no fue estadísticamente significativo en ninguna de las líneas celulares (figura 27).

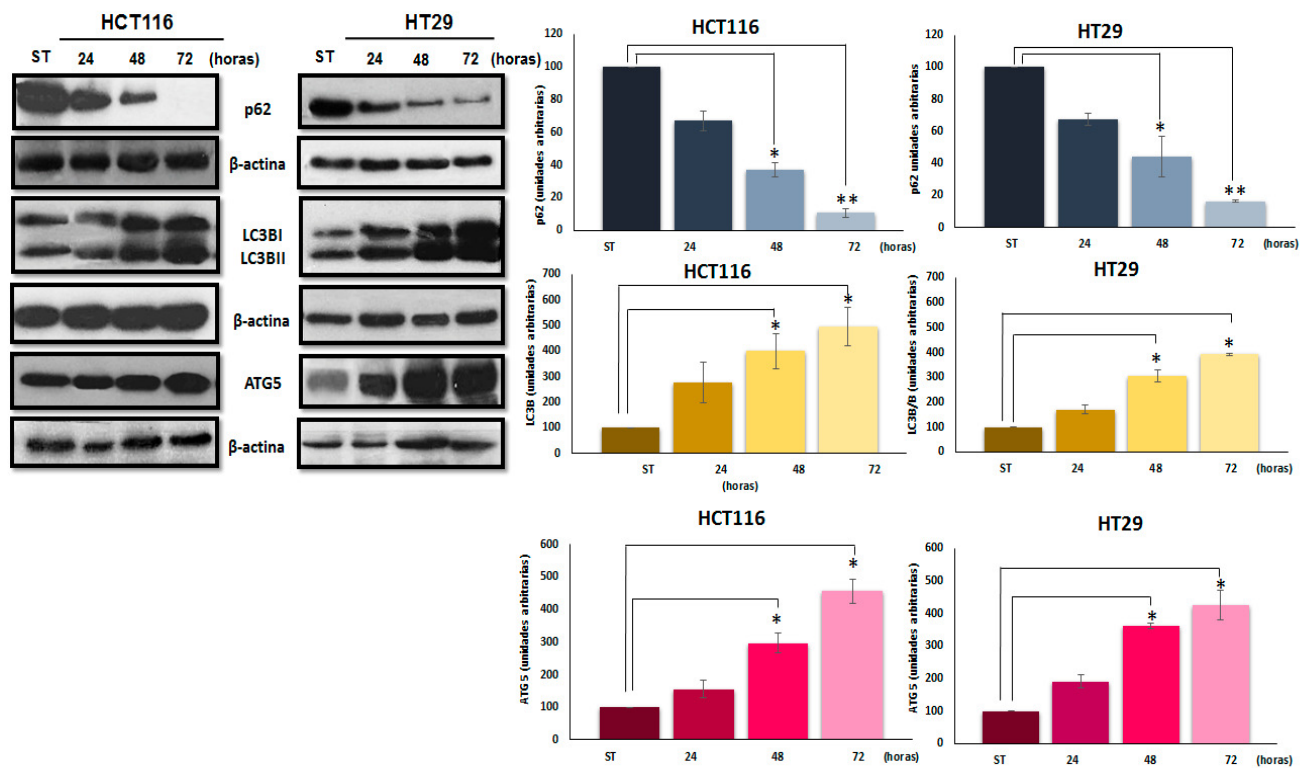
Al analizar los resultados obtenidos de la proteína ATG5 no se observaron diferencias en la expresión de los cultivos sometidos a hipoxia con respecto a las obtenidas en los cultivos en normoxia (figura 27).

Posteriormente, se analizaron los niveles de expresión de todas las proteínas anteriores al ampliar el tiempo exposición a hipoxia.

Los resultados muestran que la expresión de la proteína p62 disminuye significativamente en las dos líneas tumorales. Al cuantificar la expresión de esta proteína se pudo observar que este descenso fue estadísticamente significativo a partir de las 48 horas. Al transcurrir las 72 horas disminuye casi totalmente su expresión en las dos líneas celulares (figura 28).

Por su parte, la expresión de las proteínas LC3B/II incrementó significativamente en las dos líneas celulares a partir de las 48 horas de exposición a hipoxia, lo cual perduró hasta las 72 horas (figura 28).

Por último, la expresión de la proteína ATG5 incrementó significativamente en las dos líneas tumorales a partir de las 48 horas y se mantuvo hasta transcurrir las 72 horas (figura 28).



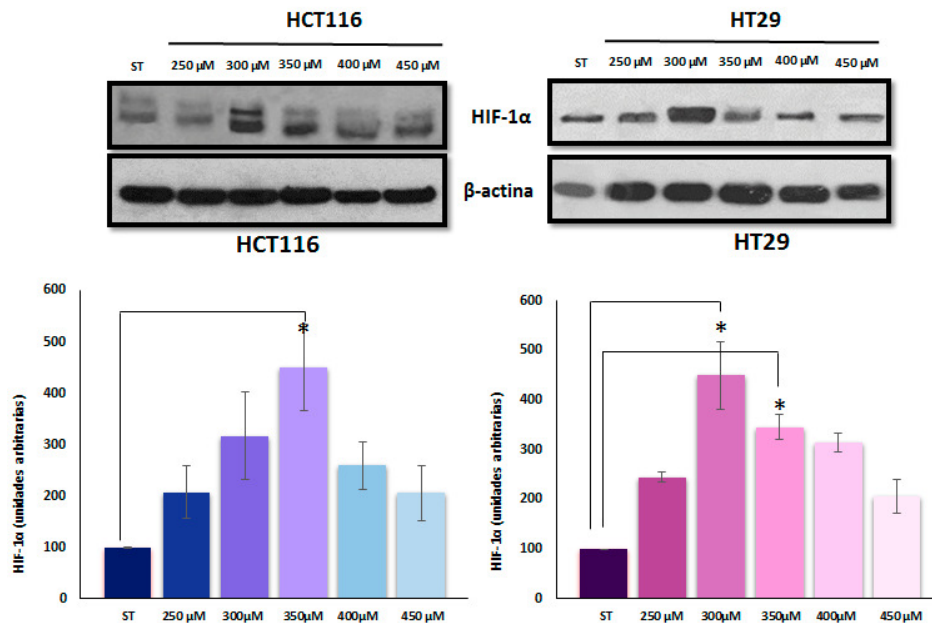
**Figura 28. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones de cultivos expuestos a 24, 48 y 72 horas en 1% de oxígeno. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. En las gráficas se observa la cuantificación de la expresión de las proteínas anteriores. Los valores del gráfico indican el promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0.01$  vs control (ST).

### 3. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A MIMETIZADORES DE HIPOXIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES COLORRECTALES

Los quelantes iónicos se han utilizado para mimetizar las condiciones hipóxicas *in vitro*. Uno de ellos es la deferoxamina (DFO), fármaco que, al igual que la hipoxia genera la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$  e induce su acumulación (138).

#### 3.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN PRESENCIA DE DFO

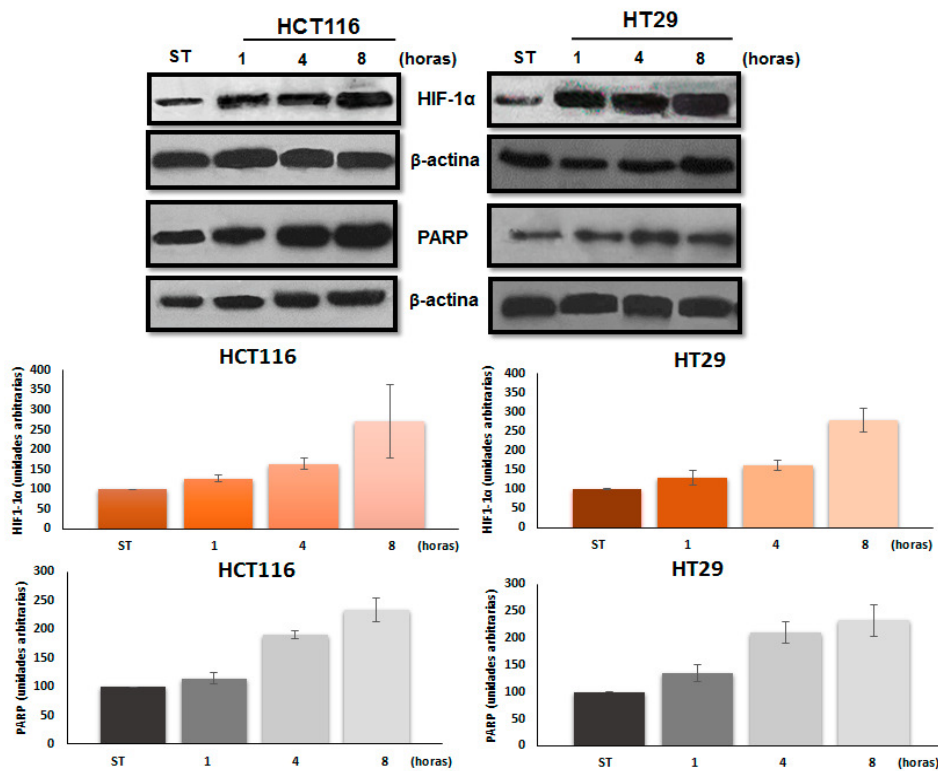
Con el fin de comprobar si el DFO ejercía un efecto similar a la hipoxia en las líneas tumorales de CCR, se realizaron ensayos con este quelante a diferentes concentraciones durante 24 horas y se estudió la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ .



**Figura 29. Expresión de la proteína HIF1- $\alpha$  en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO.** Western blot mostrando la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  a partir de extracciones proteicas de cultivos celulares expuestos durante 24 horas a diferentes concentraciones de DFO. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Además, se observa la cuantificación de la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de tres ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

En la figura 29 se pudo observar que el tratamiento con DFO en las dos líneas celulares generó mayor expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en todas las concentraciones. Sin embargo, se puede apreciar que a 300  $\mu$ M la expresión de esta proteína fue estadísticamente significativa en las dos líneas tumorales comparado con el control, por lo cual fue la concentración elegida a la cual se podría asemejar a la situación de estrés en la cual las células se exponen a baja disponibilidad de oxígeno.

Posteriormente, evaluamos la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  durante cortos períodos de exposición (1, 4 y 8 horas) a este fármaco bajo la concentración de 300  $\mu$ M. Además, para observar si en estos rangos de tiempo ocurría muerte celular por la exposición a este quelante, se analizó la expresión de la proteína PARP.

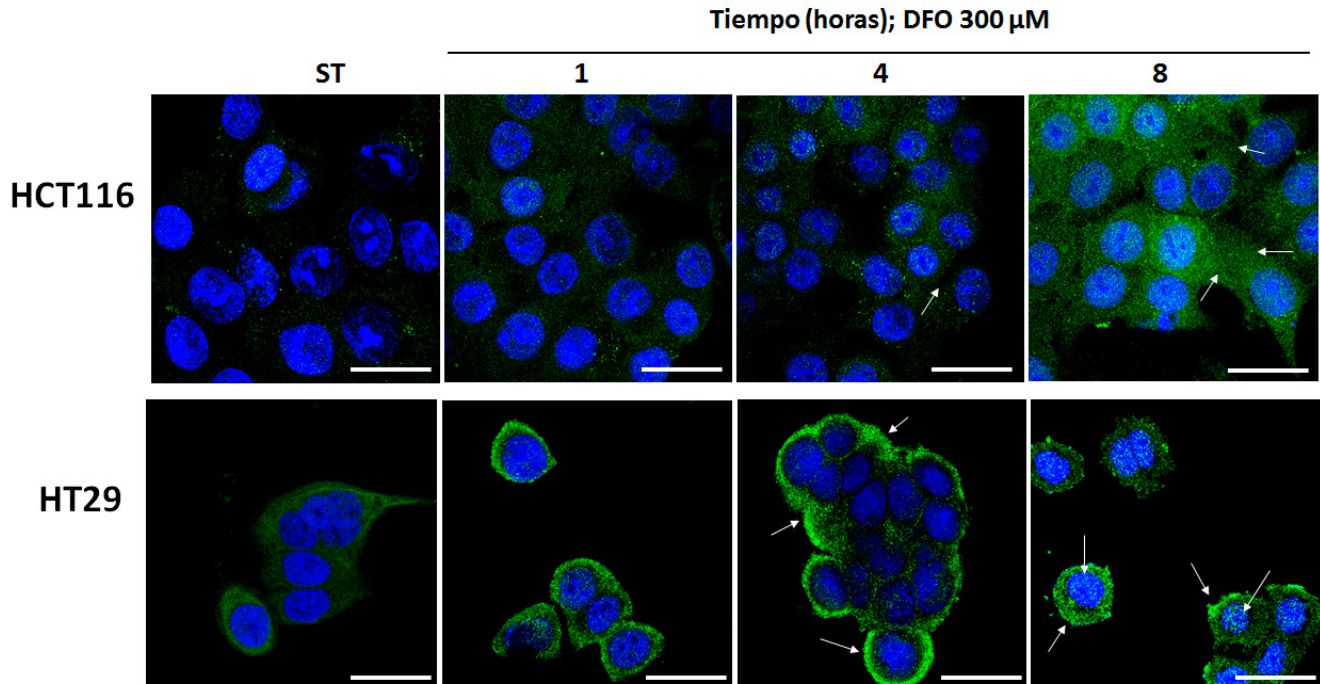


**Figura 30. Expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y la proteína PARP en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO.** Western blot mostrando la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y PARP a partir de extracciones proteicas de hechas a 1, 4 y 8 horas de exposición a DFO a 300  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Además, se observa la cuantificación de las dos proteínas dichas anteriormente. Los valores del gráfico indican el promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

En la figura 30 se pudo observar que en las dos líneas tumorales la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  aumentaba de forma dependiente al tiempo en el cual los cultivos permanecían en presencia de DFO. Sin embargo, al cuantificar los niveles proteicos el incremento de esta proteína no fue estadísticamente significativo.

La expresión de la proteína PARP fue aumentando conforme al tiempo de exposición al DFO. Es importante destacar que, aunque se observó que en la línea HCT116 existía mayor expresión de PARP que en la línea HT29, al cuantificar su expresión no se obtuvo un aumento estadísticamente significativo en ninguna de las líneas tumorales (figura 30).

Además, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el fin de corroborar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y observar su localización.

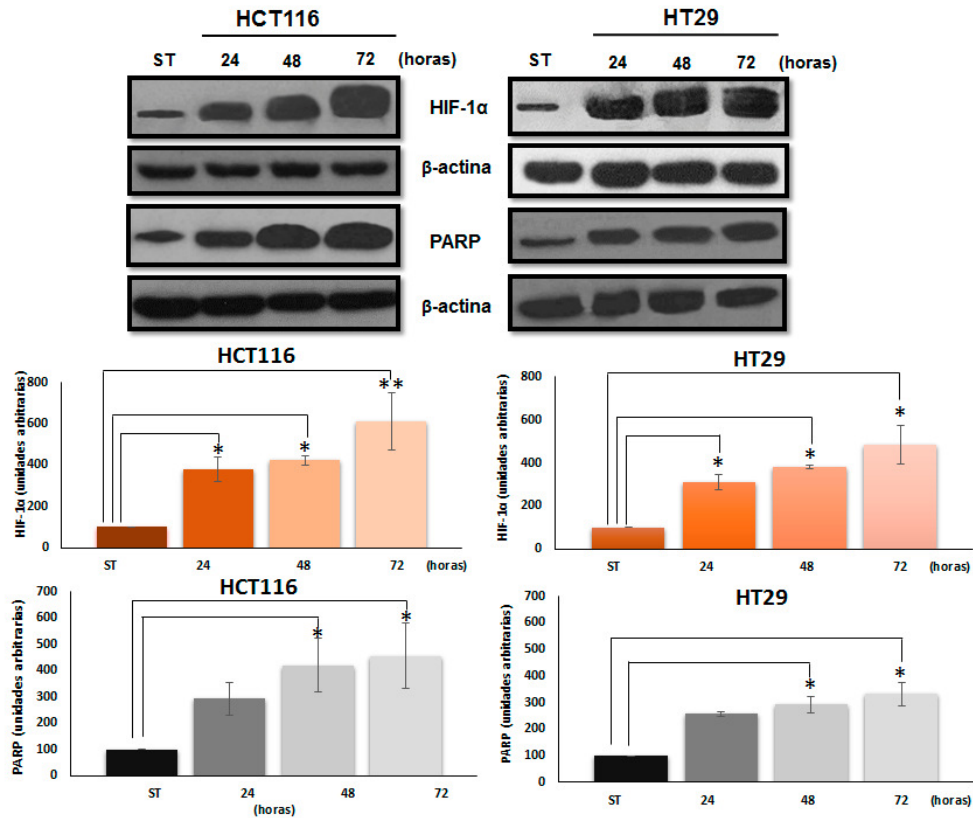


**Figura 31. El DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR. Células HCT116 y HT29 expuestas durante 1, 4 y 8 horas al DFO a 300  $\mu$ M.** Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI, los cuales se observan de color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. Las flechas blancas indican donde se observa mayor expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ . La barra blanca representa 25 micras de largo. (ST: células sin tratamiento).

En la figura 31 se observa que la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en la línea celular HT29 al pasar 1 hora de exposición al DFO se acumulaba en el citoplasma. Al incrementar el tiempo se observó el aumento progresivo de su expresión en la célula (flechas blancas figura 31). Además, tras 8 horas en tratamiento se observó acumulación de la proteína en los núcleos de las células.

En el caso de la línea celular HCT116, se pudo apreciar que a partir de las 4 horas en DFO la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue ligeramente mayor con respecto a las células en condiciones normales (señalado en la imagen con flechas blancas), además tras 8 horas de tratamiento la acumulación de la proteína se observó en el citoplasma y en algunas células en el núcleo (figura 31).

Debido a que la exposición a cortos períodos con DFO no tuvo un efecto significativo en la muerte celular en las dos líneas tumorales, se incrementó el tiempo de exposición al quelante y se evaluó la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y de PARP como marcador de muerte celular.



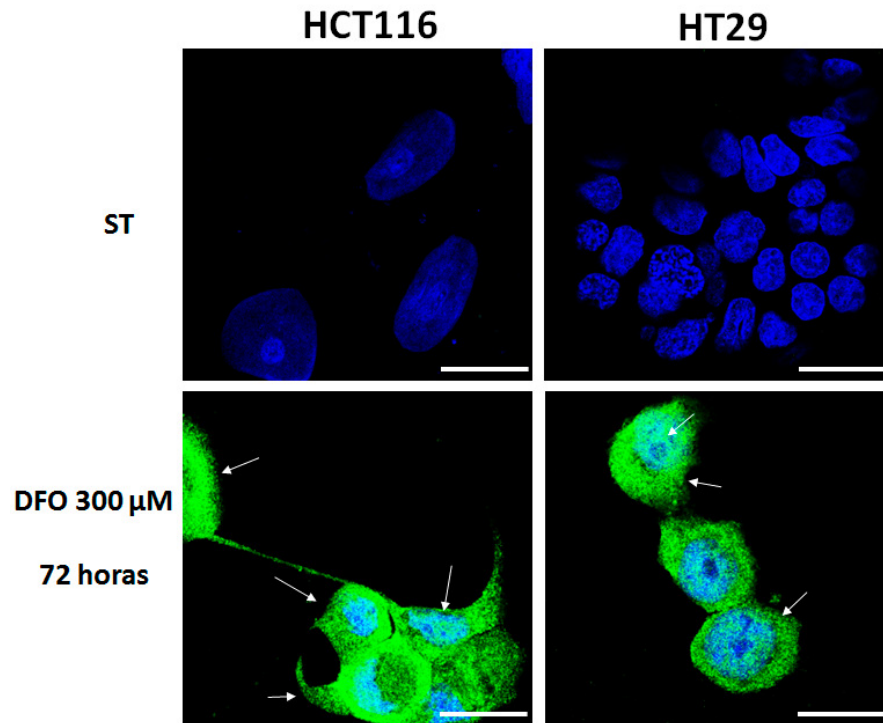
**Figura 32. Expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Los resultados de la expresión de HIF-1 $\alpha$  y PARP en las dos líneas celulares muestran un aumento progresivo de las dos proteínas con respecto al tiempo en exposición al DFO (figura 32).

La cuantificación de la expresión de HIF-1 $\alpha$  demostró que partir de las 24 horas el incremento fue estadísticamente significativo en las dos líneas tumorales. Sin embargo, en la línea tumoral HCT116 al pasar 72 horas fue significativamente mayor al observado en la línea tumoral HT29 (figura 32).

En el caso de la cuantificación de la expresión de la proteína PARP, se pudo observar que a partir de las 48 horas en exposición a este quelante el aumento de expresión fue estadísticamente significativo en las dos líneas tumorales (figura 32).

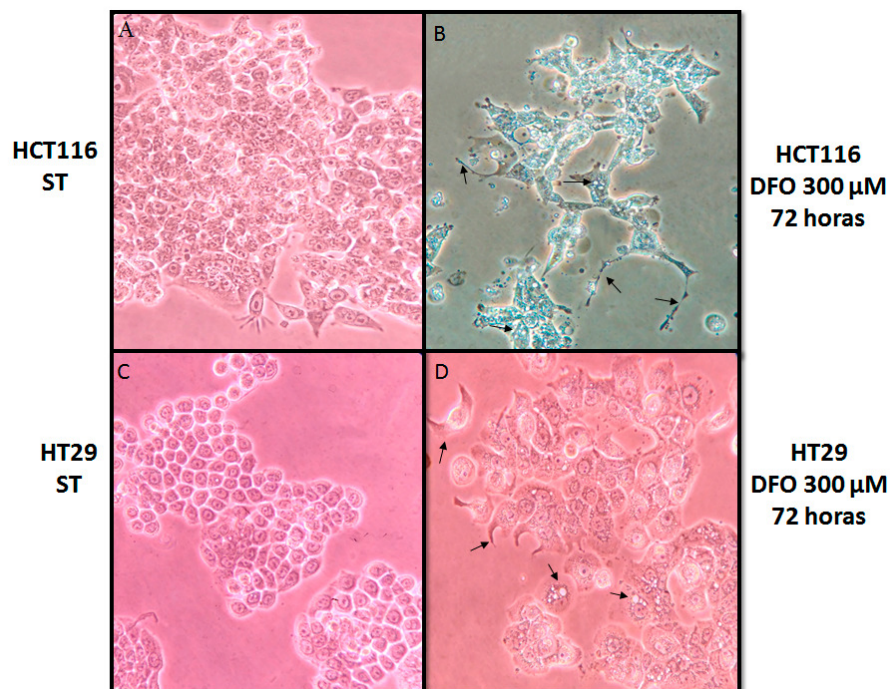
Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia, los cuales se realizaron después de que las líneas tumorales permanecieran expuestas al DFO durante 72 horas.



**Figura 33. El DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan de color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. Las imágenes presentan flechas blancas donde se observa mayor acumulación de HIF-1 $\alpha$ . La barra blanca representa 25 micras de largo. (ST: células sin tratamiento).

En la figura 33 se puede observar que la expresión de HIF-1 $\alpha$  en la línea celular HT29 al pasar las 72 horas en exposición al DFO se acumulaba mayoritariamente en el citoplasma. Además, se pudo observar que los núcleos de estas células presentaban mayor acumulación de la proteína en comparación a las 8 horas de exposición al quelante. En la línea celular HCT116 se puede apreciar que la expresión de HIF-1 $\alpha$  es bastante uniforme tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Es importante destacar que la morfología de las células expuestas al fármaco cambia y genera la formación de prolongaciones citoplasmáticas no típicas de esta línea tumoral.

Posteriormente, se analizó si ocurría un cambio en la morfología celular una vez transcurridas las 72 horas en presencia del quelante. Para ello, se obtuvieron imágenes tanto de células en condiciones normales como expuestas a 300  $\mu$ M de DFO mediante un microscopio de óptico.



**Figura 34. El DFO cambia la morfología de las células tumorales derivadas de CCR. A y C)** Cultivos de células HCT116 y HT29 transcurridas 72 horas en condiciones normales. **B y D)** Cultivos de células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  de DFO. Las fotografías con flechas negras muestran la presencia de células con mayor cantidad de vesículas y prolongaciones citoplasmáticas.

Al realizar la comparación de la morfología de las dos líneas tumorales se pudo observar que las células HCT116 presentaban prolongaciones finas, parecidas a las que presentan los fibroblastos, la extensión del citoplasma y la presencia de múltiples vesículas en el mismo, las cuales se indican con flechas negras en la imagen B de la figura 34. Es importante destacar que estas características fueron vistas cuando los cultivos celulares permanecieron en hipoxia generada por la disponibilidad de oxígeno durante el mismo rango de tiempo.

Por otra parte, en la línea HT29 se observaron prolongaciones más engrosadas y extensión de citoplasma (figura 34D), características que no se observaron en los cultivos en normoxia, ya que esta línea tumoral presenta una morfología redondeada parecida a hexágonos (figura 34C).

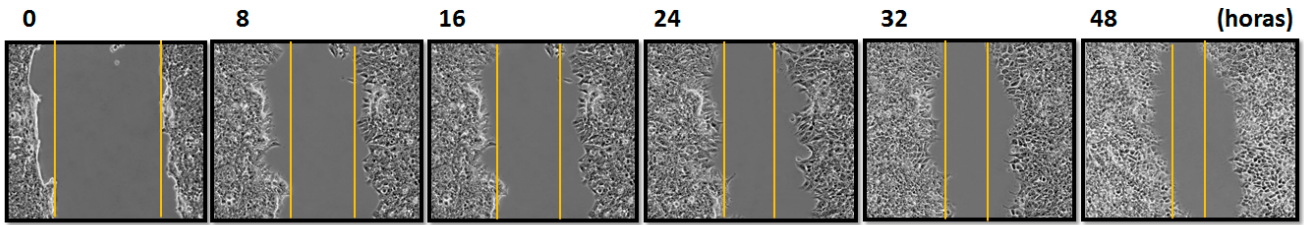
Debido a los cambios observados en la morfología de las células tumorales se realizaron ensayos de *scratch* o herida con el fin de observar si ocurría un cambio en la motilidad celular en presencia del quelante de hierro DFO. Para ello se realizaron ensayos en presencia y ausencia de DFO en ambas líneas en estudio a una concentración de 300  $\mu\text{M}$ .



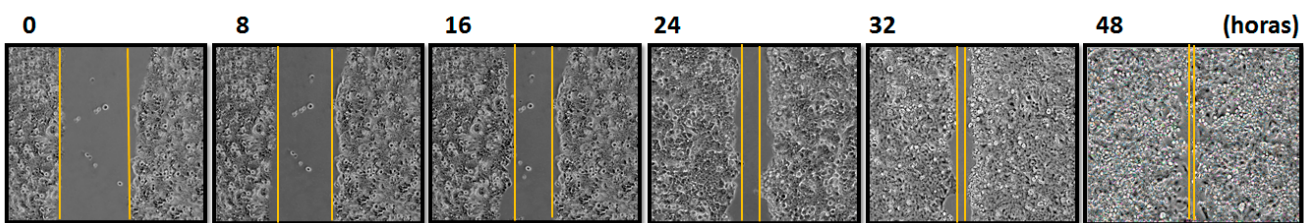
A

HCT116

Condiciones normales (ST)



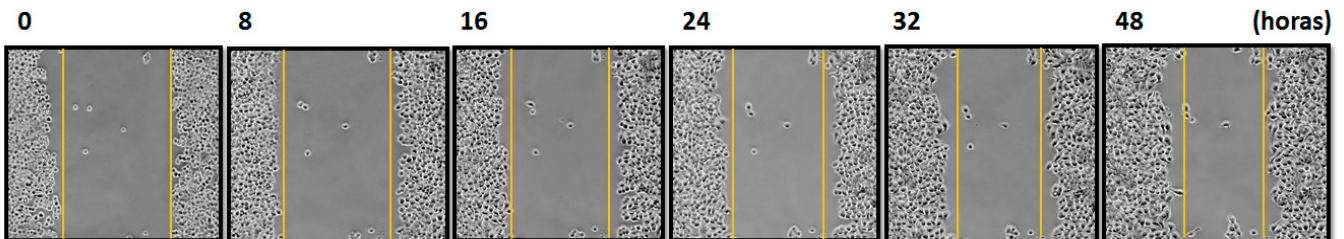
Hipoxia (300  $\mu$ M DFO)



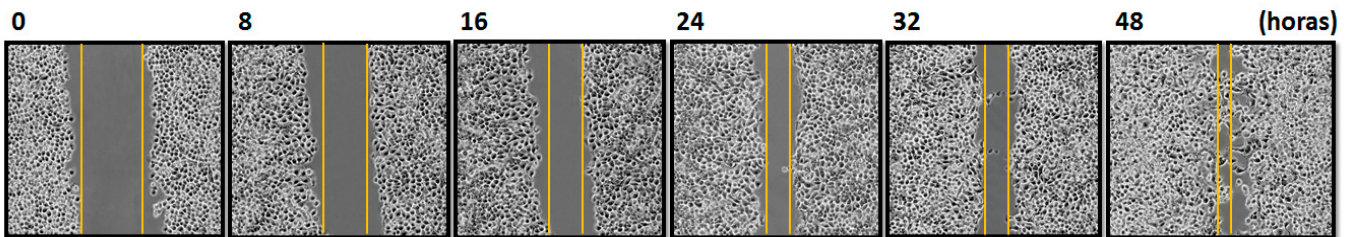
B

HT29

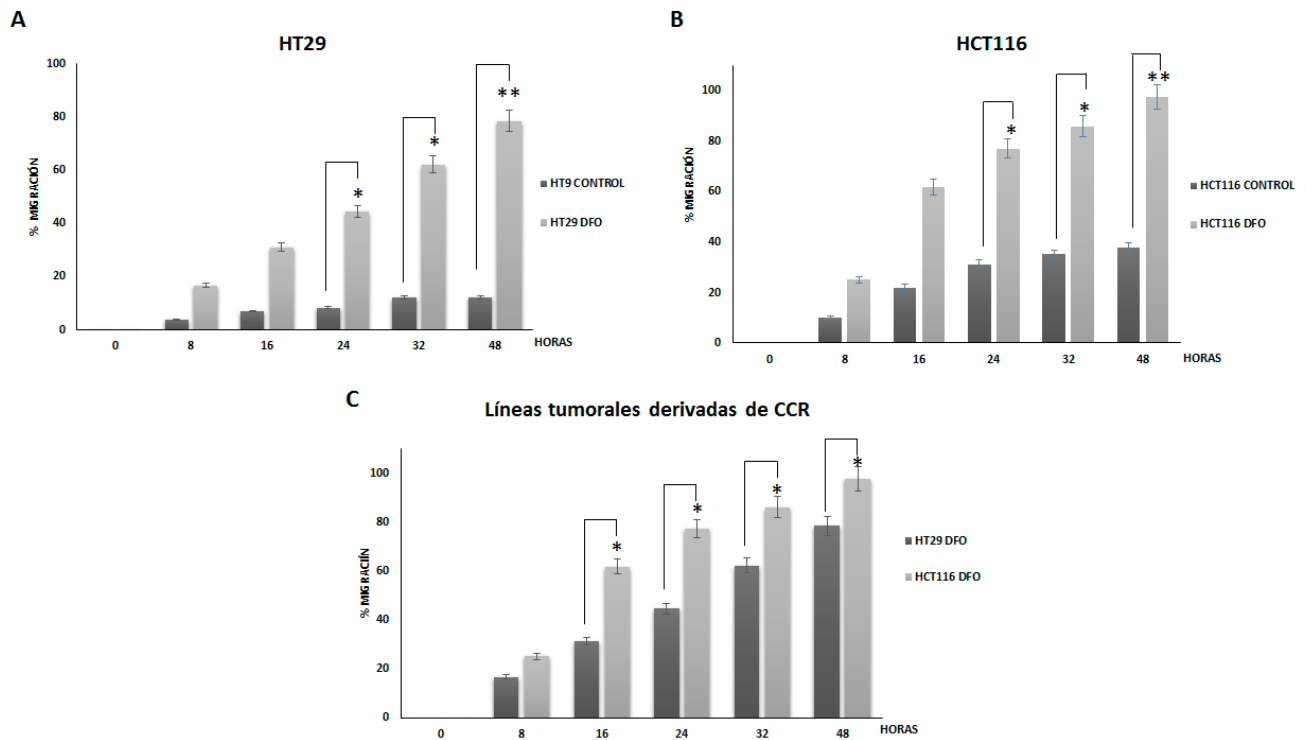
Condiciones normales (ST)



Hipoxia (300  $\mu$ M DFO)



**Figura 35. El DFO incrementa la migración de las líneas celulares derivadas de CCR. A)** Línea celular HCT116 después de 48 horas de tratamiento con el quelante DFO en comparación con las células en condiciones normales (ST). Imágenes del proceso de migración celular a 0, 8, 16, 24, 32 y 48 horas. **B)** Línea celular HT29 después de 48 horas de tratamiento con el quelante DFO en comparación con las células en condiciones normales (ST). Imágenes del proceso de migración celular a 0, 8, 16, 24, 32 y 48 horas.



**Figura 36. Cuantificación de la migración celular.** **A)** cuantificación del porcentaje de migración de la línea celular HCT116. **B)** cuantificación del porcentaje de migración de la línea celular HT29. **C)** comparación del porcentaje de migración de las dos líneas celulares derivadas de CCR. Los datos obtenidos son el promedio de seis ensayos diferentes, \* $p < 0.05$  y \*\* $p < 0.01$  vs control.

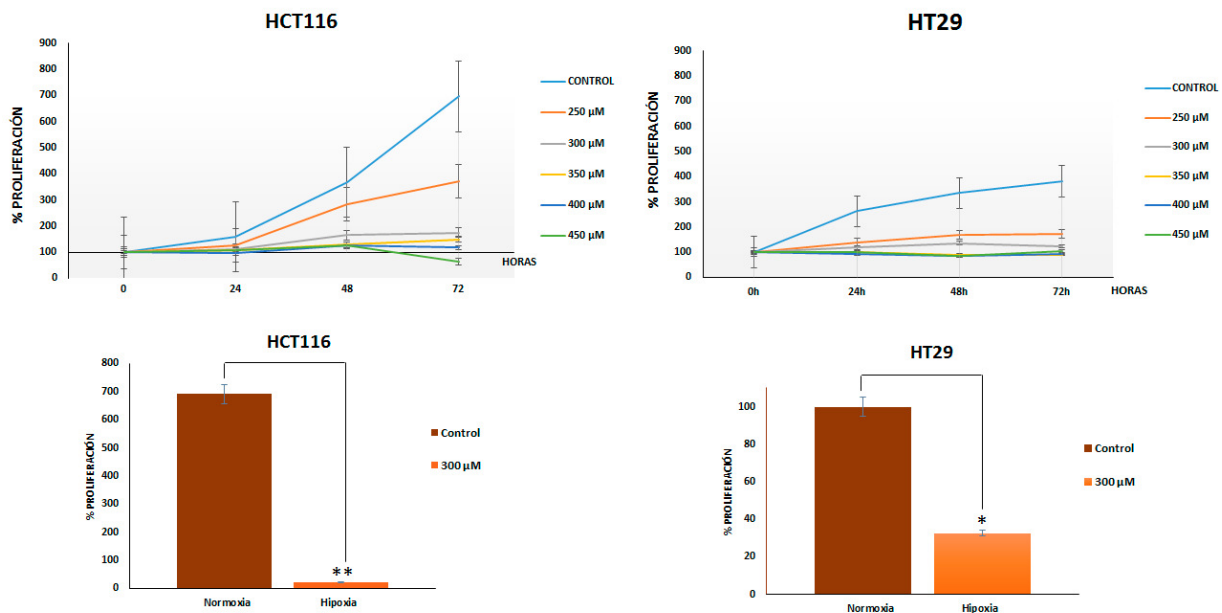
Al analizar las imágenes adquiridas de la línea HCT116 se obtuvieron los datos de los porcentajes de migración en condiciones normales y en condiciones hipóxicas (figura 36A). Estos se compararon y se observó que al pasar 8 horas en presencia de DFO el porcentaje de migración aumento en un 25% en relación al tiempo cero, mientras que las células no tratadas fue un 10%. Al transcurrir las 16 horas en DFO este porcentaje aumento hasta un 61%, mientras que las células en condiciones normales un 22%. Al pasar las 24 horas, las células tratadas migraron un 77%, mientras que los cultivos que permanecieron en condiciones normales migraron un 31%. Al pasar las 32 horas, las células en DFO migraron un 86%, hasta llegar a un 98% a las 48 horas, mientras que las células sin el quelante migraron un 35% y al pasar las 48 horas elevaron su porcentaje hasta un 38% (figura 36A). Es importante destacar que a partir de las 24 horas en exposición al quelante las células HCT116 presentaron un aumento el porcentaje de migración estadísticamente significativo con respecto aquellos que permanecieron en condiciones normales (ST).

En el caso de las imágenes obtenidas de la línea celular HT29 en las dos condiciones mencionadas (figura 36B), se obtuvo que al pasar las 8 horas en presencia de DFO la línea celular migró un 17% en relación al tiempo cero, mientras que las células no tratadas migraron un 3%. Una vez transcurridas las 16 horas en presencia de DFO las células migraron un 31%, mientras que las no tratadas un 7%. A las 24 horas, las células tratadas migraron un 44%, mientras que los cultivos celulares en condiciones normales migraron un 8%. Al pasar las 32 horas, las células en DFO migraron un 62%, hasta llegar a un 78% a las 48 horas, mientras que los cultivos sin el quelante migraron un 12% y permanecieron en ese porcentaje hasta las 48 horas (figura 36B). La comparación de la migración en condiciones normales con respecto a las condiciones hipóxicas indicó que a partir de las 24 horas en tratamiento el porcentaje de migración fue estadísticamente significativo.

Además, se realizó la comparación de los porcentajes de migración de las dos líneas tumorales expuestas a DFO. En este caso se pudo determinar que a partir de las 16 horas la línea celular HCT116 tuvo un aumento del porcentaje de migración estadísticamente significativo con respecto a la línea celular HT29 (figura 38C).

Estos resultados pueden sugerir que la exposición de al menos 24 horas a este quelante puede generar la migración de células tumorales derivadas de CCR.

Por último, se evaluó si el DFO generaba un efecto en el crecimiento y la supervivencia celular. Para ello, se realizaron diferentes ensayos de viabilidad. En este caso, las líneas tumorales se cultivaron durante 72 horas a diferentes concentraciones de DFO.

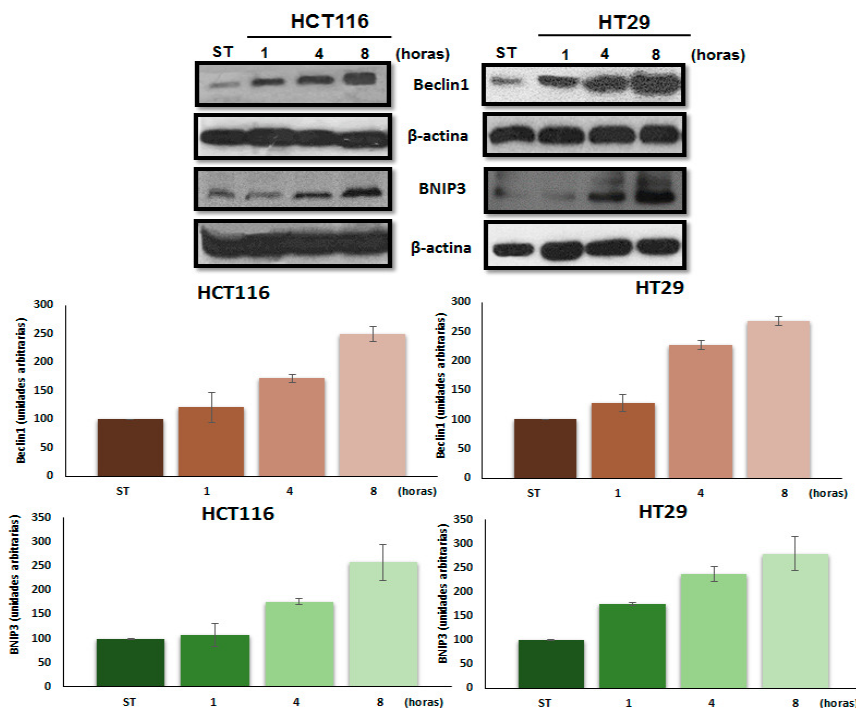


**Figura 37. El DFO disminuye la proliferación celular de las líneas tumorales derivadas de CCR.** Análisis de la proliferación de líneas celulares de CCR al ser tratadas a diferentes concentraciones de DFO a 24, 48 y 72 horas. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes. Los gráficos de barra corresponden a la comparación de la proliferación celular en condiciones normales e hipóxicas a las 72 horas de tratamiento. Los valores representados en los gráficos de barra provienen del promedio del porcentaje de proliferación de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

En la figura 37 se observa que las líneas tumorales derivadas de CCR tratadas a diferentes concentraciones crecientes de DFO disminuyen su proliferación celular. Además, se puede apreciar que a 300µM las dos líneas tumorales presentan muy poca proliferación. Al comparar el porcentaje de proliferación celular de las dos líneas tumorales expuestas a DFO a 300 µM se observó que los cultivos de las dos líneas tumorales presentaban una disminución estadísticamente significativa (figura 37).

### 3.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN PRESENCIA DE DFO

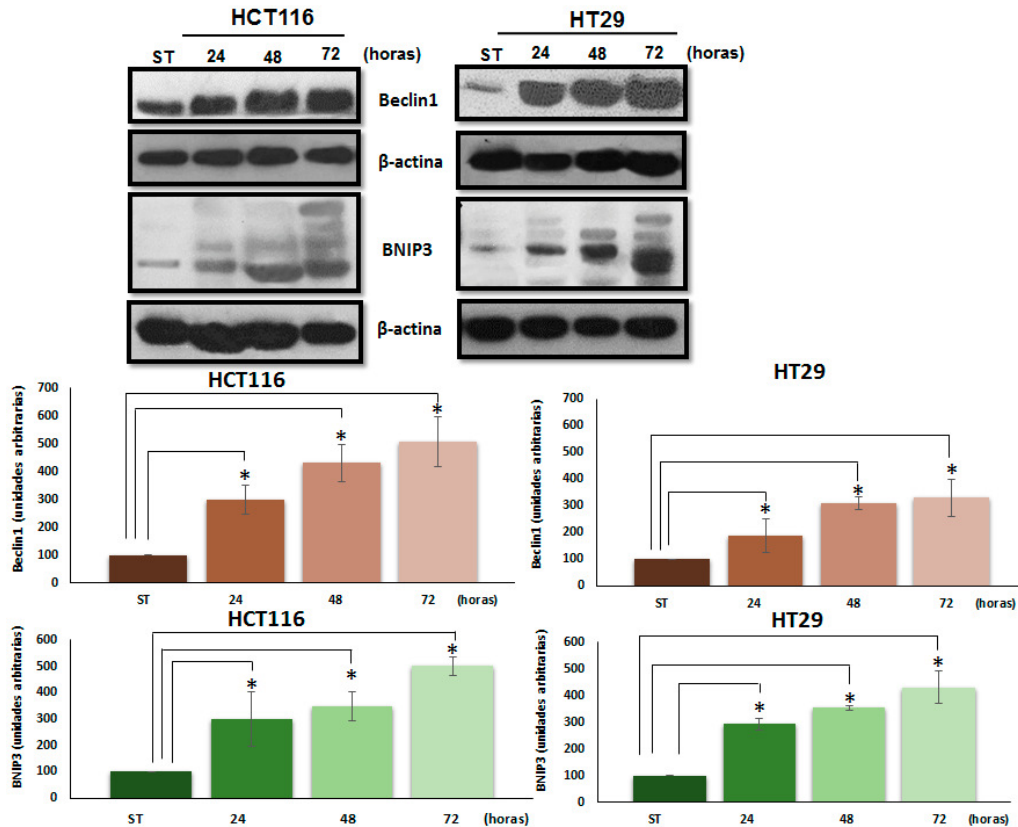
Con el fin de estudiar si ocurrían cambios en el proceso autofágico en las líneas derivadas de CCR tratadas con DFO a 300 µM, se evaluó la expresión de proteínas que intervienen en esta ruta de señalización. Al exponer a las dos líneas celulares durante un máximo de 8 horas a este quelante se pudo observar que la expresión tanto de la proteína Beclin1 como de la proteína BNIP3 presentaban un aumento dependiente del tiempo de exposición a este fármaco, el cual no fue significativo (figura 38).



**Figura 38. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 1, 4 y 8 horas al quelante DFO a 300 µM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga.

Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

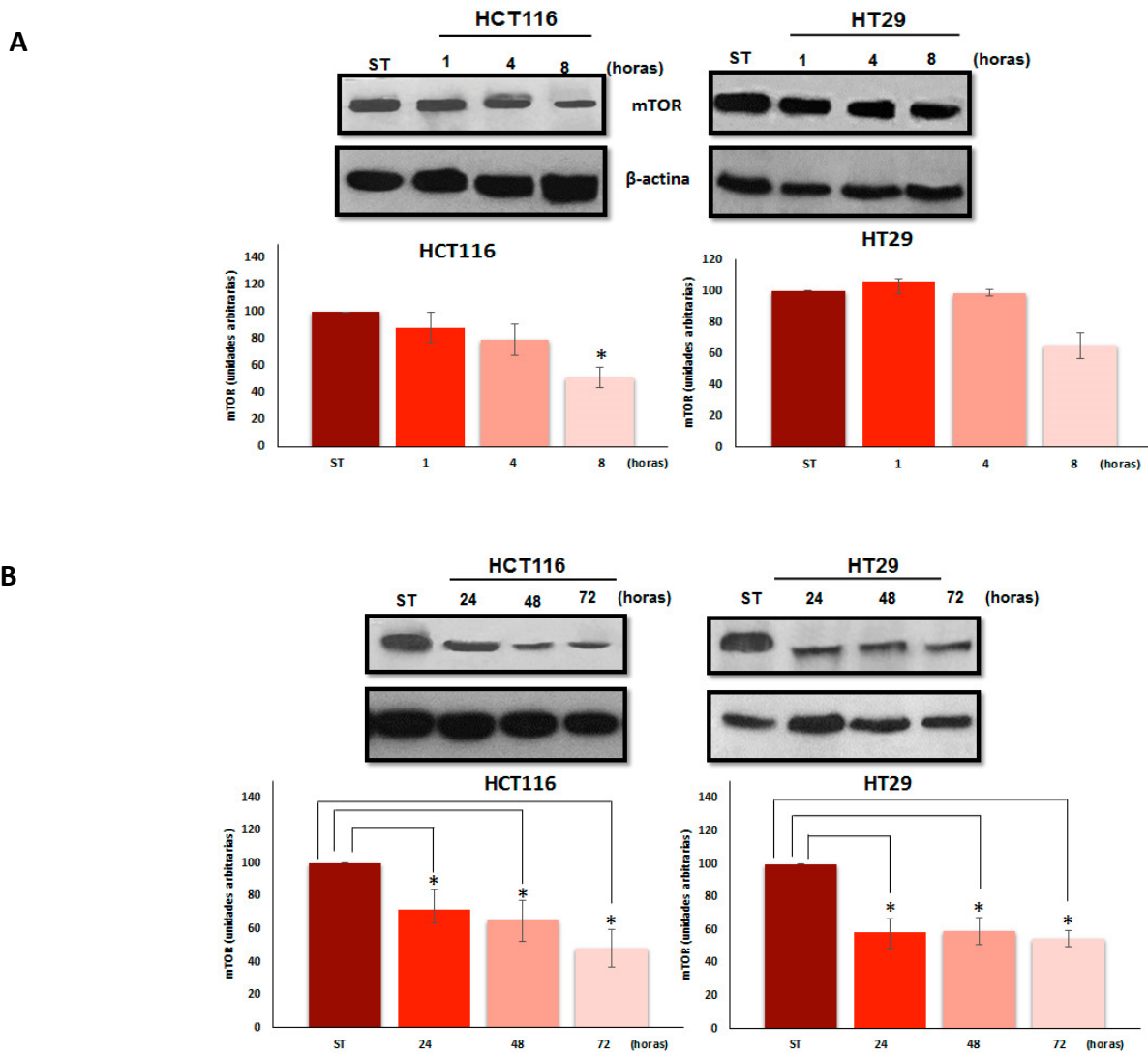
Al ampliar el tiempo de exposición al quelante se pudo observar que la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 aumentaba significativamente en las dos líneas tumorales al pasar las 24 horas de exposición manteniéndose hasta las 72 horas (figura 39).



**Figura 39. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

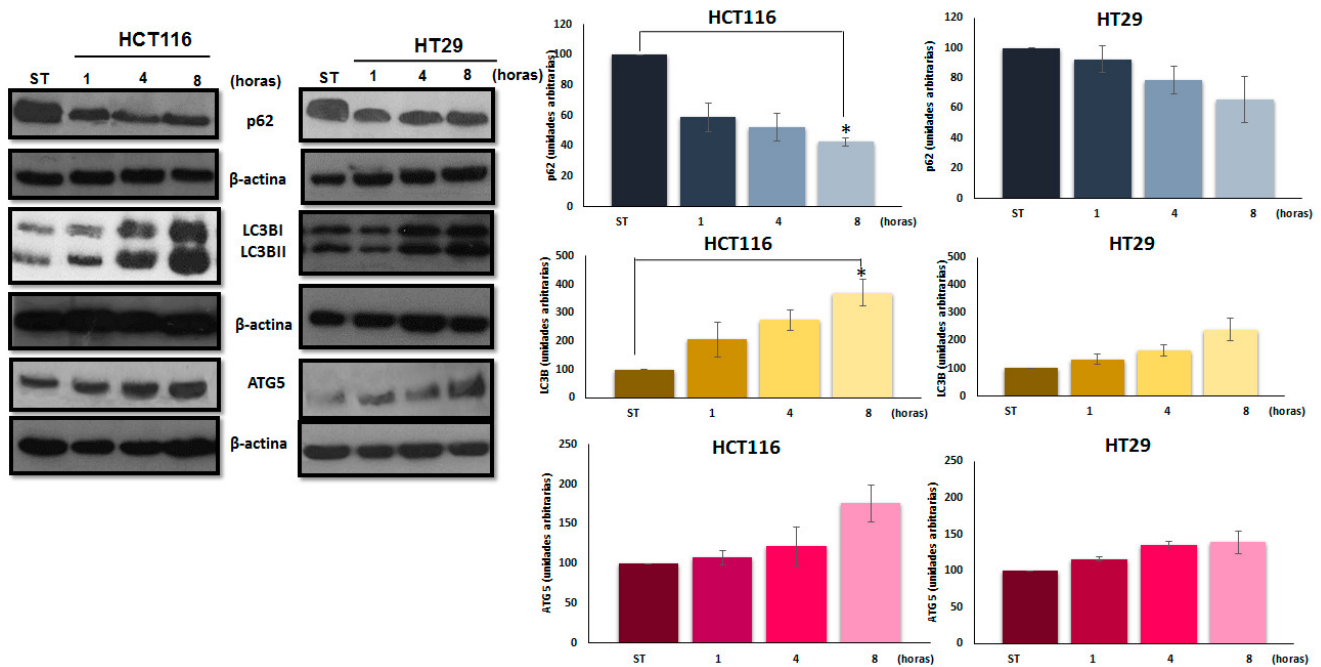
Posteriormente, se evaluó la expresión de la proteína mTOR. En este caso, se observó que a partir de las 8 horas de exposición ocurre la disminución de la expresión de la proteína en ambas líneas celulares, lo cual fue más evidente en la línea HCT116 (figura 40A). Al cuantificar su expresión se pudo apreciar que la disminución fue estadísticamente significativa solo en la línea HCT116 a partir de las 8 horas en tratamiento (figura 40A). Al ampliar el tiempo de tratamiento con el DFO se pudo apreciar que la proteína disminuía su expresión de forma significativa con respecto al tiempo de exposición a partir

de las 24 horas de tratamiento en las dos líneas celulares. Es importante destacar que la expresión de mTOR tras 72 horas de exposición al DFO se mantuvo estable (figura 40B).



**Figura 40. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO. A)** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST). **B)** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Además, se analizaron los niveles de expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5 (figura 41).



**Figura 41. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 1, 4 y 8 horas en presencia de 300  $\mu$ M de DFO. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

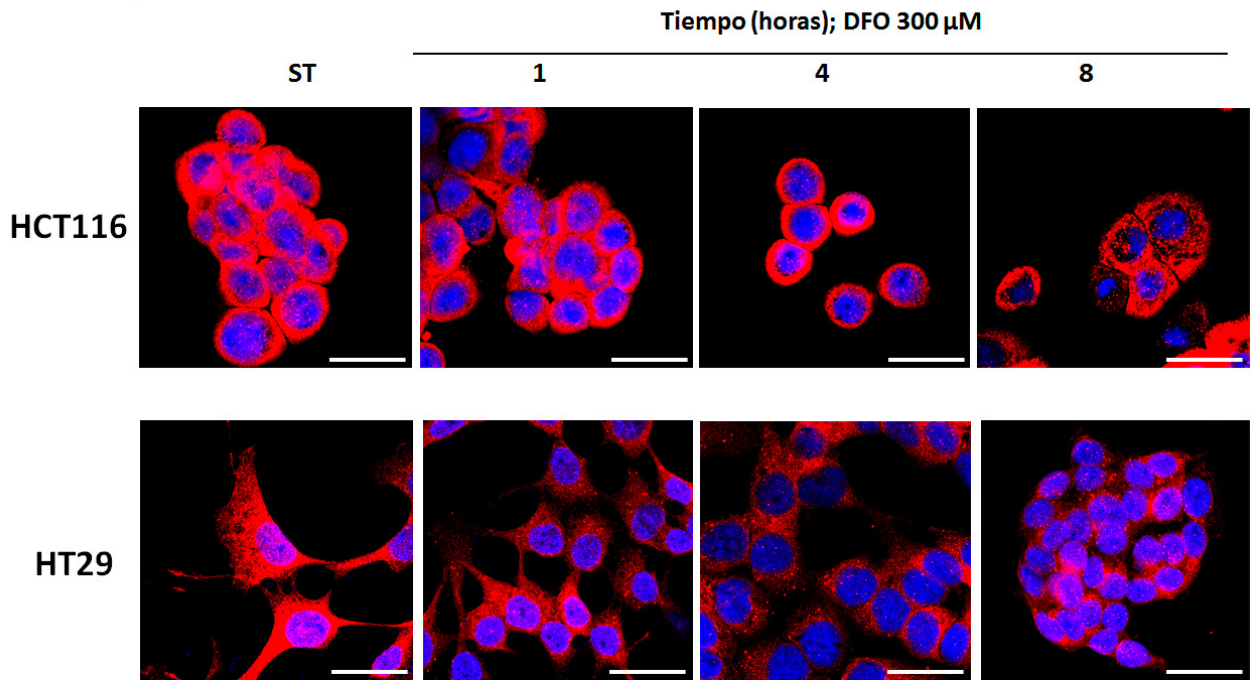
Al analizar los resultados obtenidos de la proteína p62 se pudo observar que disminuye su expresión de forma dependiente al tiempo en exposición al DFO en las dos líneas celulares. Sin embargo, solo fue estadísticamente significativo tras 8 horas en la línea HCT116 (figura 44).

La expresión de LC3BI/II aumentó de forma dependiente al tiempo de exposición de las células a DFO. En la figura 41 se puede observar que la expresión empieza a incrementar a las 4 horas de tratamiento en las dos líneas celulares. Sin embargo, en la línea HCT116 el aumento de la expresión fue significativo a partir de las 8 horas, lo que no ocurrió en la línea HT29.

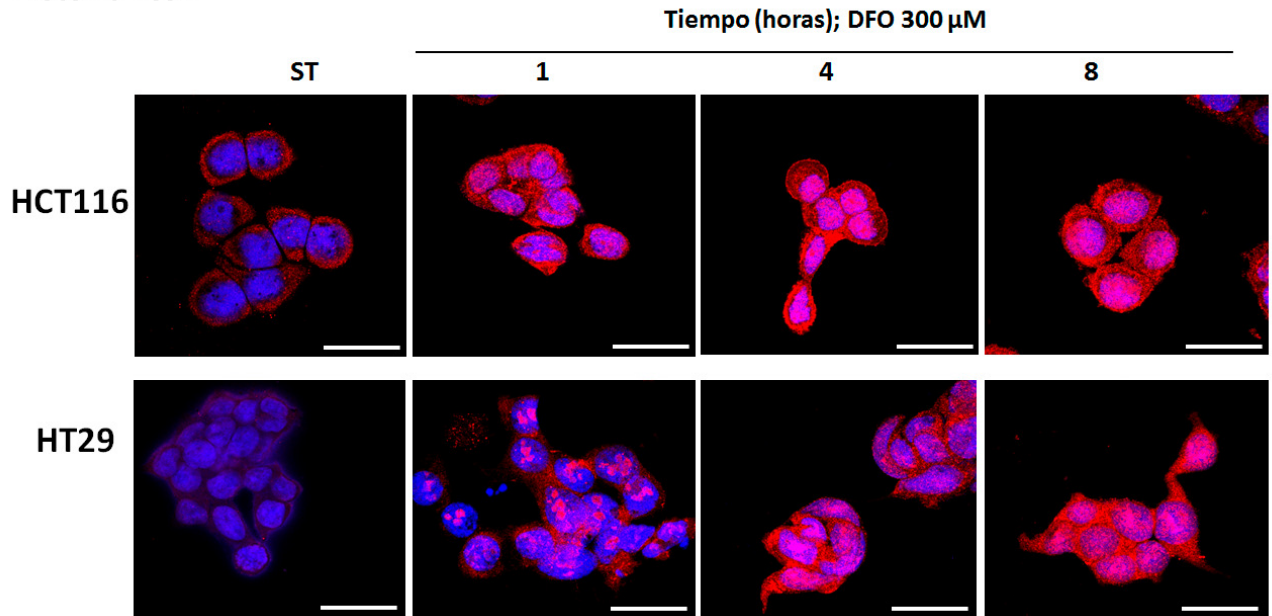
Por último, se analizó la variación de la expresión de la proteína ATG5. Como se puede observar en la figura 41, no se observó un aumento significativo de esta proteína en las dos líneas celulares estudiadas.

Por otro lado, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas celulares con el fin de observar la expresión y localización de las proteínas LC3B y p62.

Proteína p62



Proteína LC3B



**Figura 42. El DFO incrementa la expresión de LC3B y disminuye la expresión de p62 en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 1, 4 y 8 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).



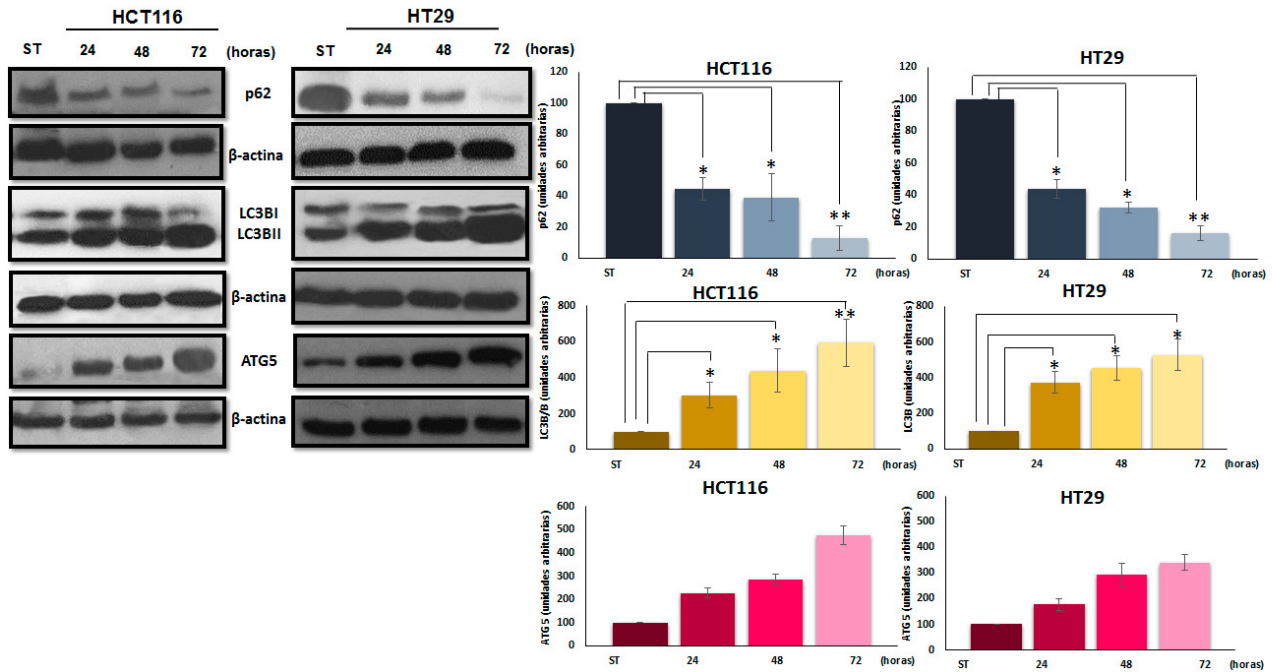
En la figura 42 se observa que la proteína p62 se distribuye en todo el citoplasma en las dos líneas tumorales sin tratamiento (ST). Es importante destacar que en algunas células se observó la acumulación de la proteína dentro del núcleo. Al evaluar la expresión y localización de p62 con respecto al tiempo de exposición al fármaco se pudo observar la disminución en la expresión de la proteína en las dos líneas celulares y la formación de acúmulos tras 8 horas de tratamiento.

En el caso de la proteína LC3B, se pudo apreciar que en las células sin tratar la expresión es baja y se encuentra principalmente en el citoplasma. Una vez que las células estuvieron expuestas al DFO la expresión de LC3B fue en aumento (figura 42). A partir de la primera hora en tratamiento se observó la acumulación de esta proteína en los núcleos de las células. Al pasar las 4 horas, su distribución fue tanto en el citoplasma como en el núcleo y esto se hace más evidente al pasar más tiempo de exposición a DFO.

Al evaluar la expresión de las tres proteínas anteriores incrementando el tiempo de exposición al quelante se observó que la expresión de p62 en las dos líneas celulares a partir de las 24 horas de tratamiento disminuye significativamente (figura 43). Además, se observaron diferencias, ya que en las células HT29 la expresión llega a ser casi nula con respecto a la observada en las células HCT116.

El análisis de la expresión de las proteínas LC3BI/II indicó el aumento estadísticamente significativo de estas isoformas a partir de las 24 horas en presencia de DFO. Además, se pudo apreciar que en las dos líneas tumorales ocurre el incremento de la isoforma LC3BII con respecto a la isoforma LC3BI (figura 43)

Al evaluar la variación de la expresión de la proteína ATG5 se pudo observar que, aunque el aumento de la expresión fue progresivo respecto al tiempo en exposición al tratamiento, este no fue estadísticamente significativo (figura 43)

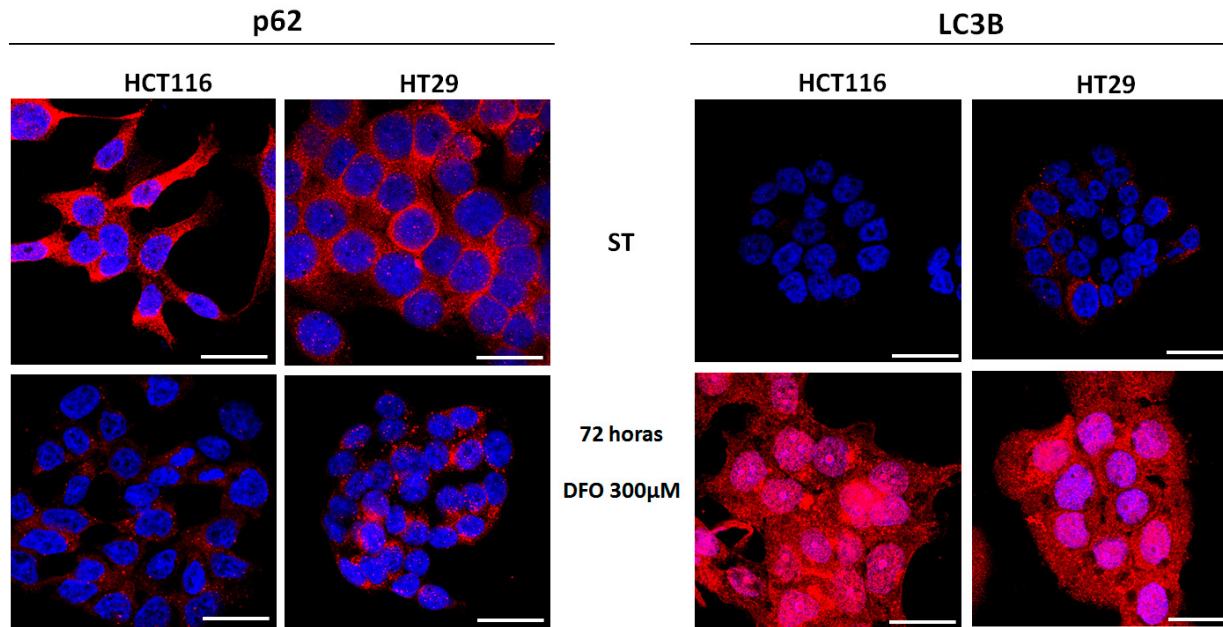


**Figura 43. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300 μM de DFO. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Por otro lado, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en ambas líneas celulares con el fin de corroborar la expresión observada en los resultados anteriores y apreciar la localización de las proteínas LC3B y p62. Estos ensayos se realizaron en las dos líneas celulares tras ser tratadas durante 72 horas en presencia de DFO

En la figura 44 se observa que en condiciones de normoxia las dos líneas tumorales la proteína p62 se localiza mayoritariamente en el citoplasma. Al evaluar la expresión y localización de p62 tras 72 horas en presencia de DFO se observó una disminución de la expresión. Además, la formación acúmulos mayoritariamente en el citoplasma.

En el caso de las proteínas LC3B/II, se apreció que en las células en normoxia la expresión de la misma se localiza mayormente en el citoplasma. Tras la exposición al DFO la expresión aumentó considerablemente y se localizó de forma uniforme por todo el citoplasma y núcleo en las dos líneas celulares (figura 44).



**Figura 44. El DFO incrementa la expresión de LC3B y disminuye la expresión de p62 en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300 µM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI los cuales se observan de color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

## 4. NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS BASADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES COLORRECTALES EXPUESTAS A MIMETIZADORES DE HIPOXIA.

Con el fin de estudiar la respuesta que presentan los tumores colorrectales expuestos a mimetizadores de hipoxia a compuestos modificadores de la autofagia, se seleccionaron diferentes fármacos:

**Metformina:** un conocido antidiabético que, al inhibir mTOR, activa la autofagia.

**Decitabina®:** un análogo de pirimidina que se introduce en la doble cadena del DNA durante su síntesis e inhibe su metilación, favoreciendo la autofagia.

**Cloroquina:** un agente alcalinizante usado como antimalárico, que inhibe la actividad de las hidrolasas del lisosoma y, por tanto, inhibe la autofagia.

**Panobinostat®:** un inhibidor de histonas desacetilasas que activa la autofagia.

**Paclitaxel:** un inhibidor de microtúbulos que inhibe la formación del autofagolisosoma, inhibiendo por tanto el proceso de autofagia en sus etapas finales.

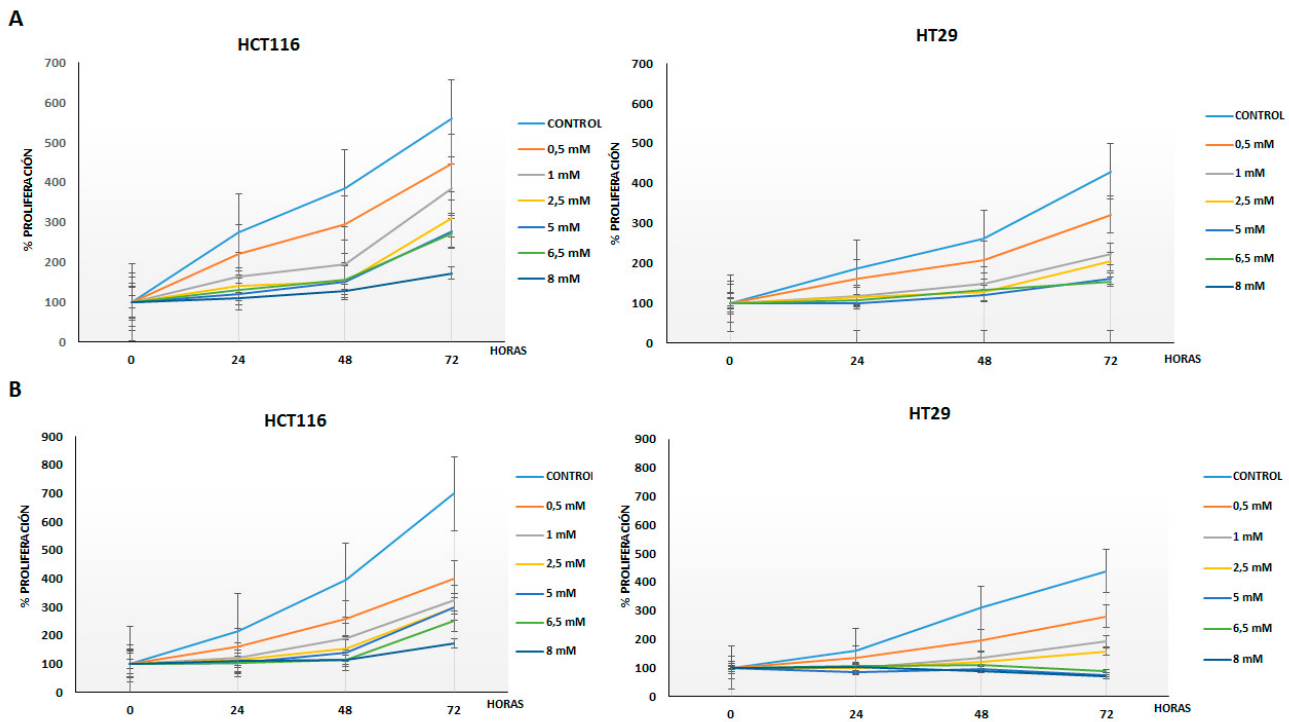
### 4.1 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO METFORMINA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO

Para evaluar si la metformina generaba un efecto en la proliferación celular en las líneas tumorales HCT116 y HT29 se realizaron ensayos de viabilidad usando las concentraciones de 0,5, 1, 2,5, 5, 6,5 y 8 mM cada 24 horas durante un máximo de 72 horas. Los resultados obtenidos indican que en las dos líneas celulares se vio una disminución de la viabilidad a medida que se utilizaban concentraciones crecientes del fármaco (Figura 45A).

Posteriormente, se evaluó el efecto de la combinación del tratamiento con metformina en presencia de DFO. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad utilizando las mismas concentraciones anteriores del fármaco metformina pero en presencia del quelante de hierro a una concentración de 300  $\mu$ M.

En este caso, en las dos líneas celulares se vio una disminución de la viabilidad a medida que se utilizaban concentraciones crecientes del fármaco. No obstante, se pudo observar que la proliferación celular de las dos líneas tumorales disminuyó en todas las concentraciones utilizadas de metformina al estar expuestas al DFO (figura 45B).

Debido a que no se observaron diferencias apreciables en la proliferación celular a partir de 5 mM, la concentración de metformina elegida para llevar a cabo estudios de morfología, expresión de proteínas e inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales fue de 8 mM.



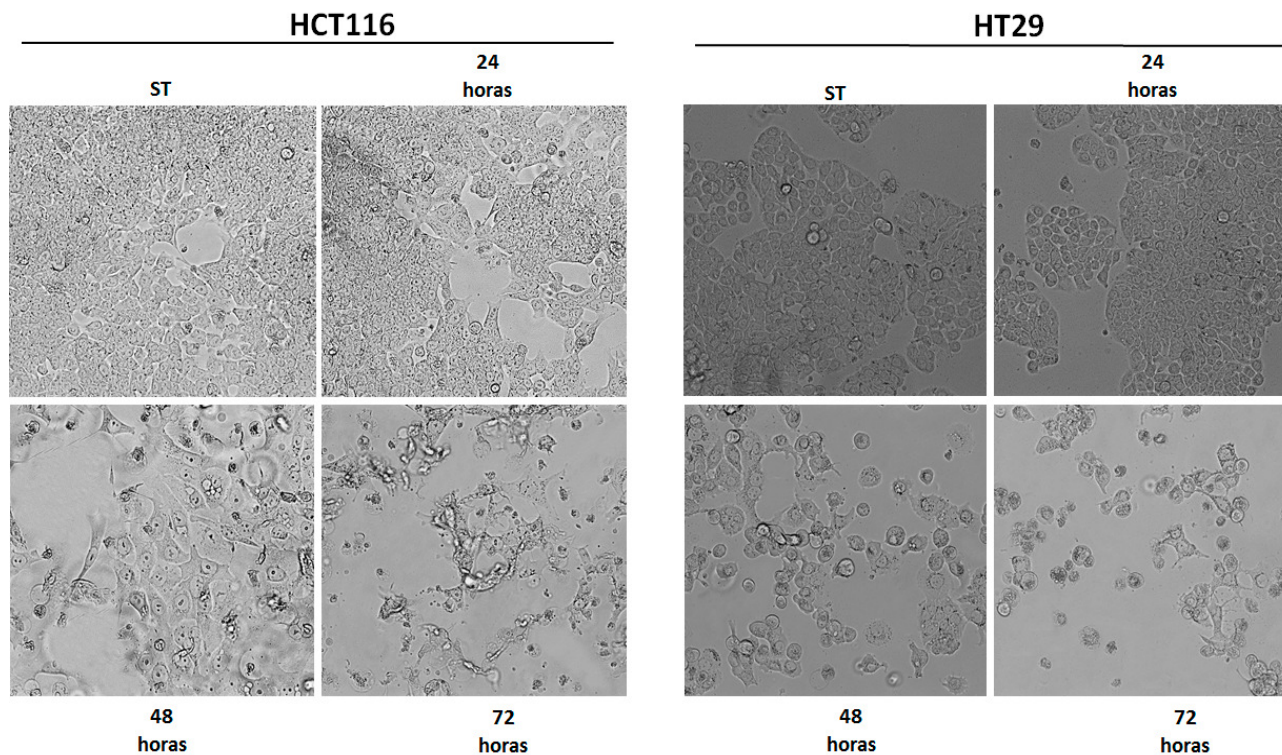
**Figura 45. El tratamiento combinado de metformina y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. A)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento único con metformina durante 72 horas a diferentes concentraciones. **B)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento combinado metformina y DFO. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes.

Después de realizar los análisis de proliferación, se analizó la morfología celular. Para ello, se adquirieron imágenes mediante un microscopio óptico de los cultivos que fueron expuestos a hipoxia a través del DFO y tratados con el fármaco metformina a una concentración de 8 mM cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

Al analizar la morfología celular de las dos líneas tumorales cada 24 horas se observaron diferentes características. En el caso de la línea HCT116, no hubo variación en su morfología hasta pasar las 48 horas, cuando se pudo apreciar la presencia de prolongaciones finas, parecidas a las que presentan los fibroblastos; además, la extensión del citoplasma y la aparición de grandes vesículas en el mismo en algunas células. Por último, a las 72 horas se observó mayor cantidad de células muertas, así como mayor número de vesículas en el citoplasma (figura 46).

La línea HT29 no presentó cambios en su morfología hasta las 48 horas, cuando se observó mayor cantidad de células muertas que en la línea HCT116, prolongaciones más engrosadas, extensión del citoplasma, pérdida de su morfología hexagonal. En algunos casos se observó

morfología circular y tamaño celular mucho mayor, así como también mayor cantidad de vesículas en el citoplasma. A las 72 horas las características mencionadas permanecieron; además, se pudo apreciar mayor cantidad de vesículas en el citoplasma de las células (figura 46).



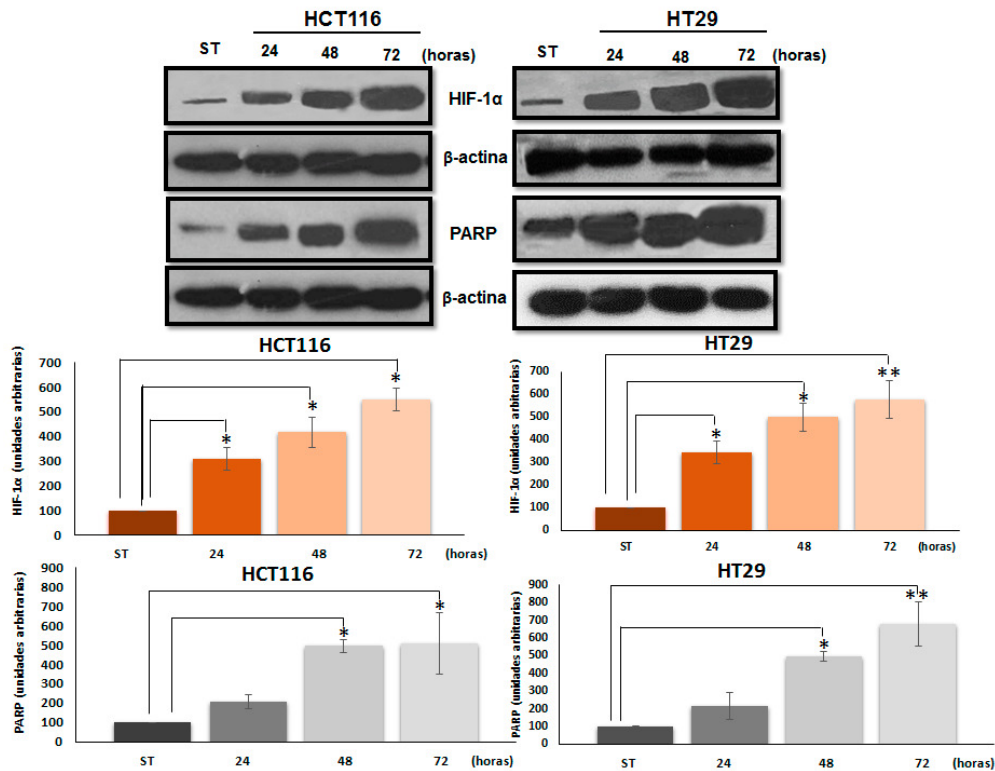
**Figura 46.** El tratamiento conjunto metformina-DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR. Las imágenes muestran el cambio de la morfología celular durante 72 horas de tratamiento.

#### 4.1.2 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN LÍNEAS TUMORALES DE CCR TRATADAS CON METFORMINA Y DFO

Para analizar si el efecto del tratamiento con metformina generaba un cambio en la proteína HIF-1 $\alpha$  se evaluó su expresión. Para ello, las células fueron tratadas con el fármaco a concentración 8 mM y en presencia de DFO durante 24, 48 y 72 horas. Además, para observar si ocurría variación en la muerte celular por el tratamiento realizado se evaluó la expresión de la proteína PARP en los mismos rangos de tiempo.

La expresión de HIF-1 $\alpha$  aumentó progresivamente tras 72 horas en presencia de metformina y DFO en las dos líneas celulares. Al cuantificar su expresión se pudo apreciar que en la línea HT29 el aumento fue estadísticamente mayor con respecto a la línea HCT116 (figura 47).

Al realizar el estudio de la expresión de la proteína PARP se observaron diferencias entre las dos líneas celulares. En el caso de HCT116, se observó un aumento progresivo hasta las 72 horas, mientras que en la línea HT29 a partir de las 48 horas el aumento fue mayor que el observado en HCT116 (figura 50). Al cuantificar la expresión se pudo ver que en los dos tipos celulares la expresión aumentó significativamente a partir de las 48 horas, sin embargo, tras 72 horas de tratamiento el aumento fue mayor en la línea HT29 (figura 47).

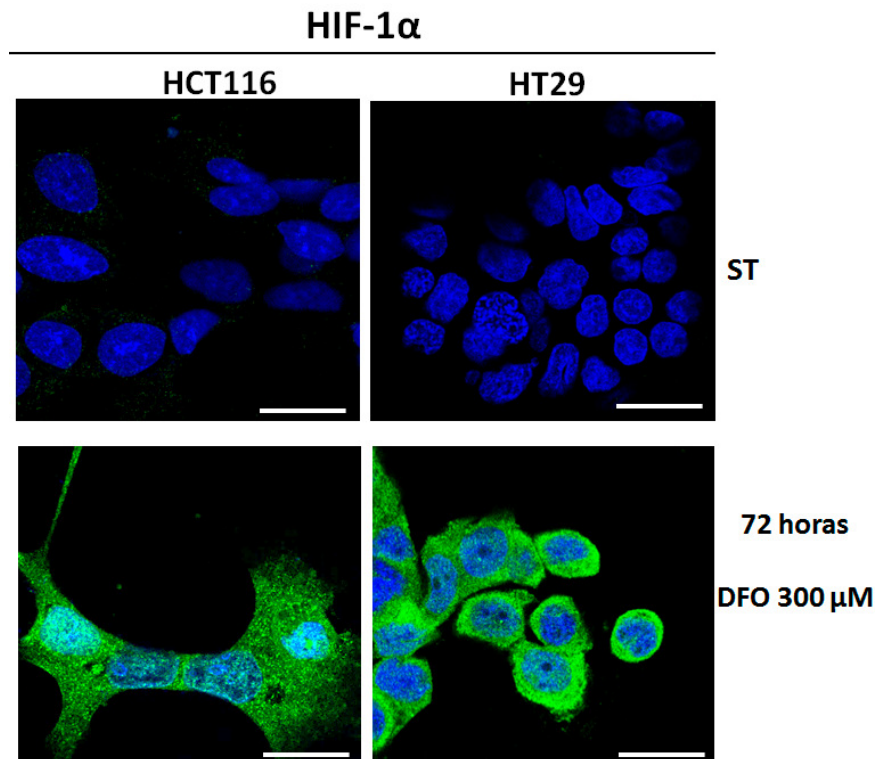


**Figura 47. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO y metformina. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el fin de corroborar la expresión de la proteína HIF-1α y observar su localización. Estos ensayos se realizaron en cultivos expuestos a DFO durante 72 horas bajo una concentración de 8 mM de metformina. En la figura 48 se muestran imágenes obtenidas a partir de las inmunofluorescencias realizadas bajo las condiciones descritas anteriormente.

En las imágenes se puede observar que en los cultivos que permanecieron en normoxia durante 72 horas hay poca expresión de la proteína HIF-1α. Sin embargo, en las imágenes obtenidas a partir de los cultivos en tratamiento la proteína se acumulaba en el citoplasma mayoritariamente. Es

importante destacar que en los núcleos de las células de la línea HCT116 había mayor acumulación de HIF-1 $\alpha$  que en las células de la línea HT29.



**Figura 48. El tratamiento metformina-DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300  $\mu$ M y metformina a 8 mM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

#### 4.1.3 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO Y METFORMINA

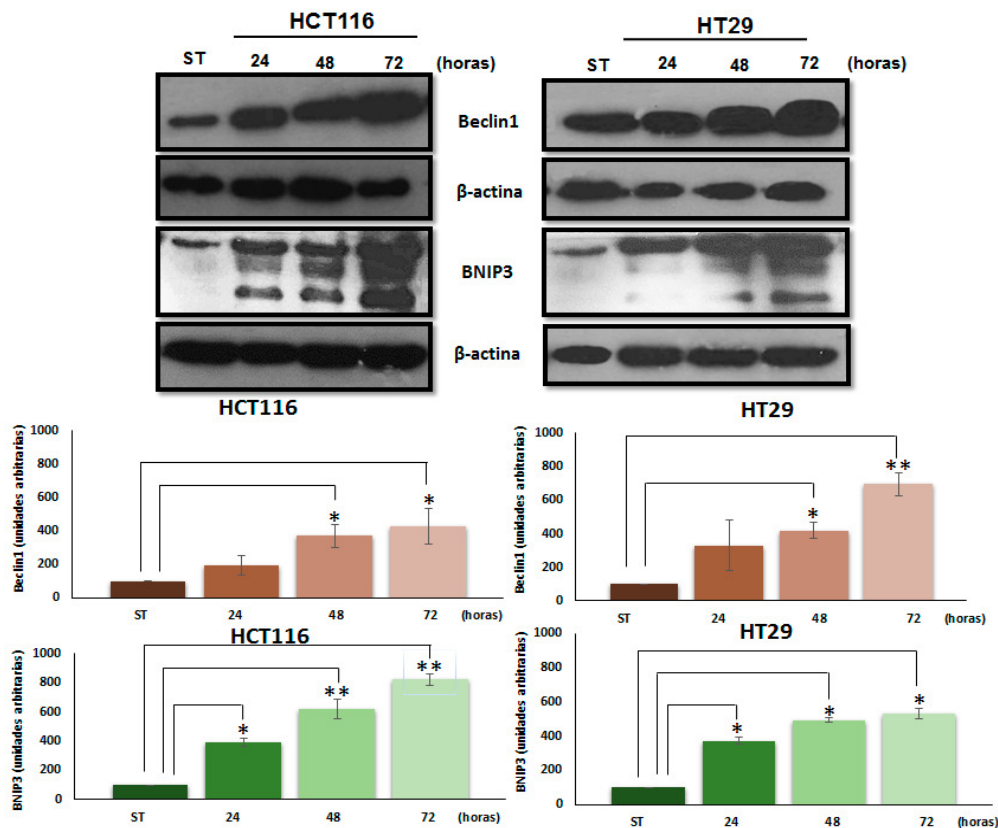
Para analizar el efecto de la metformina sobre la autofagia en condiciones hipóxicas se estudió la expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3, mTOR, p62, LC3BI/II, y ATG5 en las líneas celulares HCT116 Y HT29 tratadas con dicho fármaco a 8 mM y en presencia de DFO a 300  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Además, en estas dos líneas celulares se estudió por inmunofluorescencia la expresión de las proteínas p62 y LC3B.

El estudio de expresión de Beclin1 mostró que en las dos líneas tumorales había un aumento progresivo de la expresión de la proteína (figura 49). La cuantificación de la expresión indicó que en la línea HCT116 había un incremento de la expresión a lo largo del tiempo, que fue significativo a partir



de las 48 horas. Por su parte, la expresión de Beclin1 en la línea HT29 fue progresiva. Al pasar las 72 horas la expresión fue el doble de la observada en la línea HCT116 (figura 49).

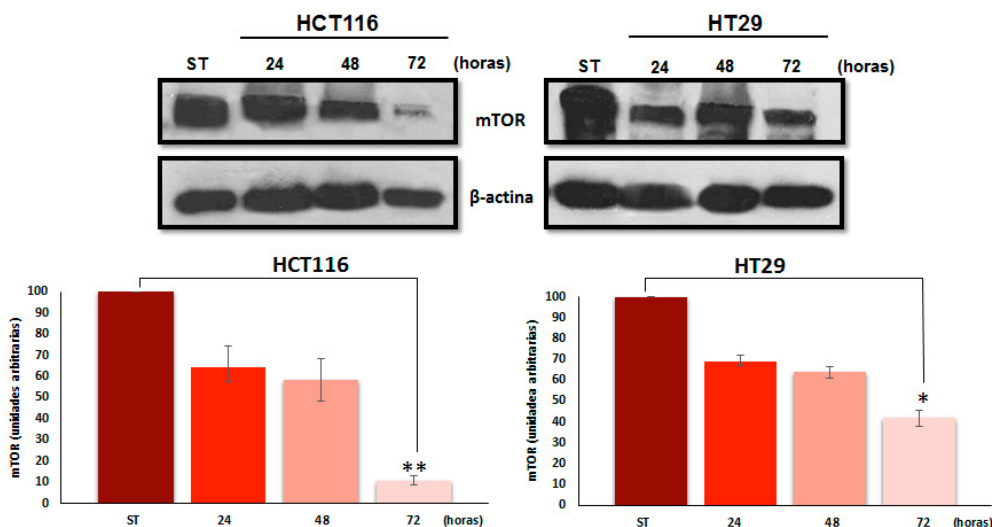
El estudio de la expresión de BNIP3 mostró que ambas líneas tumorales presentaban un aumento progresivo de la expresión de la proteína (figura 49). La cuantificación reflejó que las dos líneas tumorales presentaron un aumento significativo de la expresión de esta proteína a partir de las 24 horas, sin embargo, en la línea HCT116 a partir de las 72 horas la expresión de BNIP3 fue el doble de la observada en la línea HT29 (figura 49).



**Figura 49. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y metformina.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y metformina a 8 mM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

En el caso del estudio de la proteína mTOR, no se observó la disminución de su expresión hasta las 48 horas en las dos líneas tumorales. Sin embargo, al pasar las 72 horas se observaron diferencias entre estos dos tipos celulares. En la línea HCT116 la expresión de la proteína es inhibida casi totalmente, mientras que en la línea HT29 disminuyó ligeramente con respecto a las 48 horas (figura

53). Al realizar la cuantificación de la expresión se reflejó que la disminución observada a las 72 horas en tratamiento fue estadísticamente significativa en las dos líneas celulares, sin embargo, en las células HCT116 fue significativamente menor que en las células HT29 (figura 50).

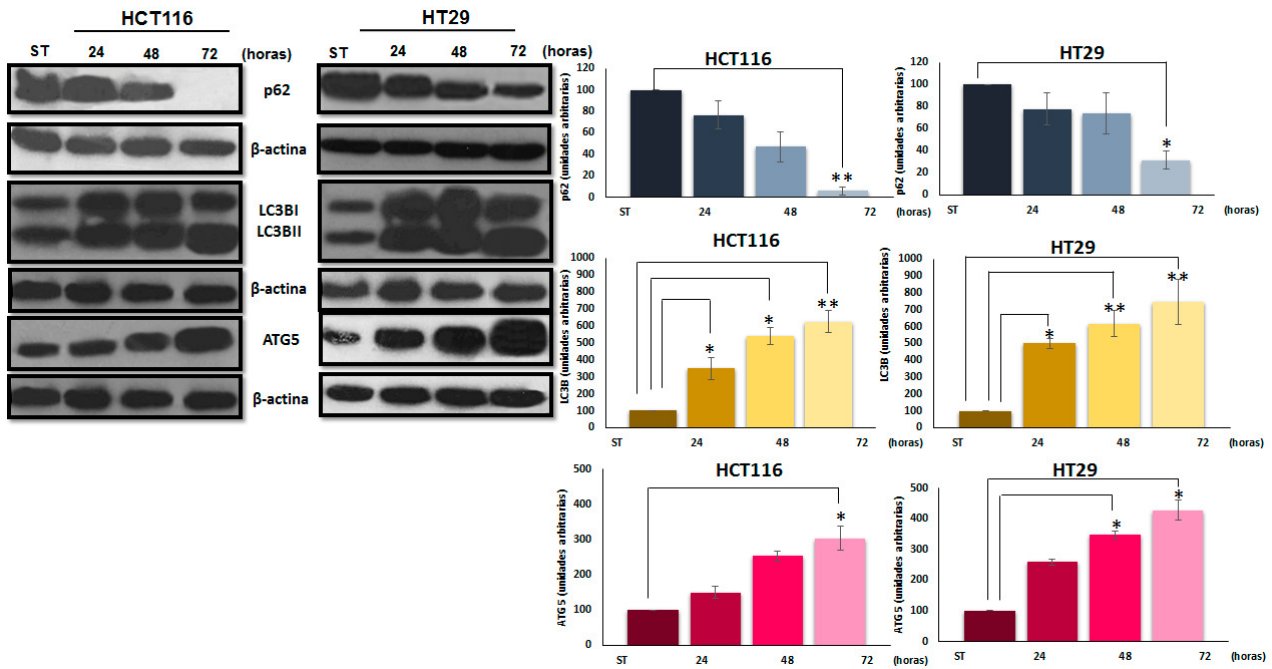


**Figura 50. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y metformina.** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y metformina a 8 mM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

El análisis de la expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5 mostró que la proteína p62 disminuye de forma dependiente del tiempo que permanecen los cultivos en tratamiento (figura 51). Es importante destacar que en la línea HCT116 se apreció la inhibición total de la expresión de la proteína al pasar las 72 horas en tratamiento (figura 51). El análisis de la cuantificación reflejó que en las dos líneas celulares la disminución de p62 fue estadísticamente significativa tras 72 horas de tratamiento.

En segundo lugar, se evaluó la variación de la expresión de las proteínas LC3BI/II, observándose que el aumento de la expresión de estas dos proteínas ocurría de forma dependiente al tiempo de exposición de las células al tratamiento. Además, la expresión de estas dos isoformas aumentaba significativamente a partir de las 24 horas bajo estas condiciones, lo que incrementó cuando los cultivos permanecieron 72 horas en tratamiento (figura 51).

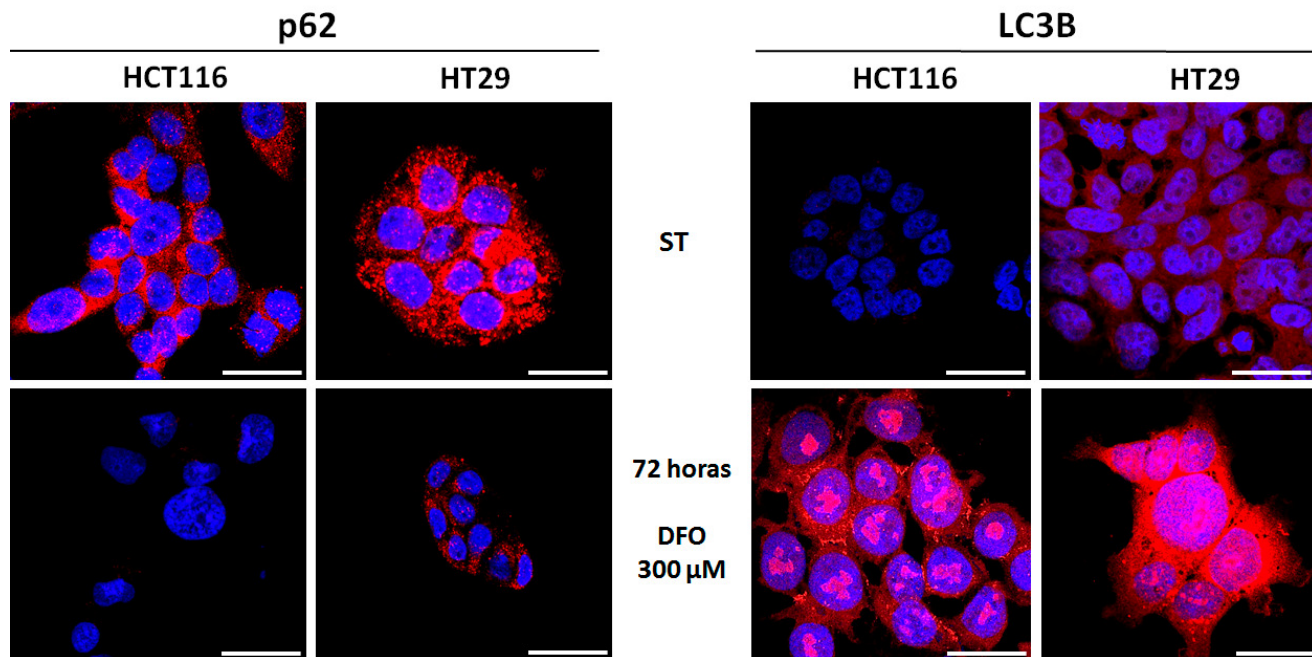
En tercer y último lugar se analizó la variación de la expresión de la proteína ATG5. Como se puede observar en la figura 51, el aumento de la expresión de esta proteína en las dos líneas celulares fue progresivo. Se pudo observar que en la línea celular HT29 hubo un aumento significativo al pasar los cultivos celulares 48 horas en tratamiento, sin embargo, en las células HCT116 este aumento se observó al transcurrir las 72 horas.



**Figura 51. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y metformina.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300  $\mu$ M de DFO y 8 mM de metformina. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Los ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales tratadas con metformina en presencia de DFO mostraron la disminución de la proteína p62, así como una leve acumulación alrededor del núcleo al transcurrir las 72 horas en tratamiento, lo que no ocurre en las células en normoxia, donde la proteína se expresa mayoritariamente en todo el citoplasma (figura 52).

En el caso de la proteína LC3B, se pudo apreciar que las células que permanecieron en normoxia durante 72 horas presentaban poca expresión de la proteína, la cual se localizaba mayormente en el citoplasma, mientras las células tratadas con metformina y DFO la expresión de LC3B aumentó considerablemente dentro y alrededor del núcleo (figura 52).

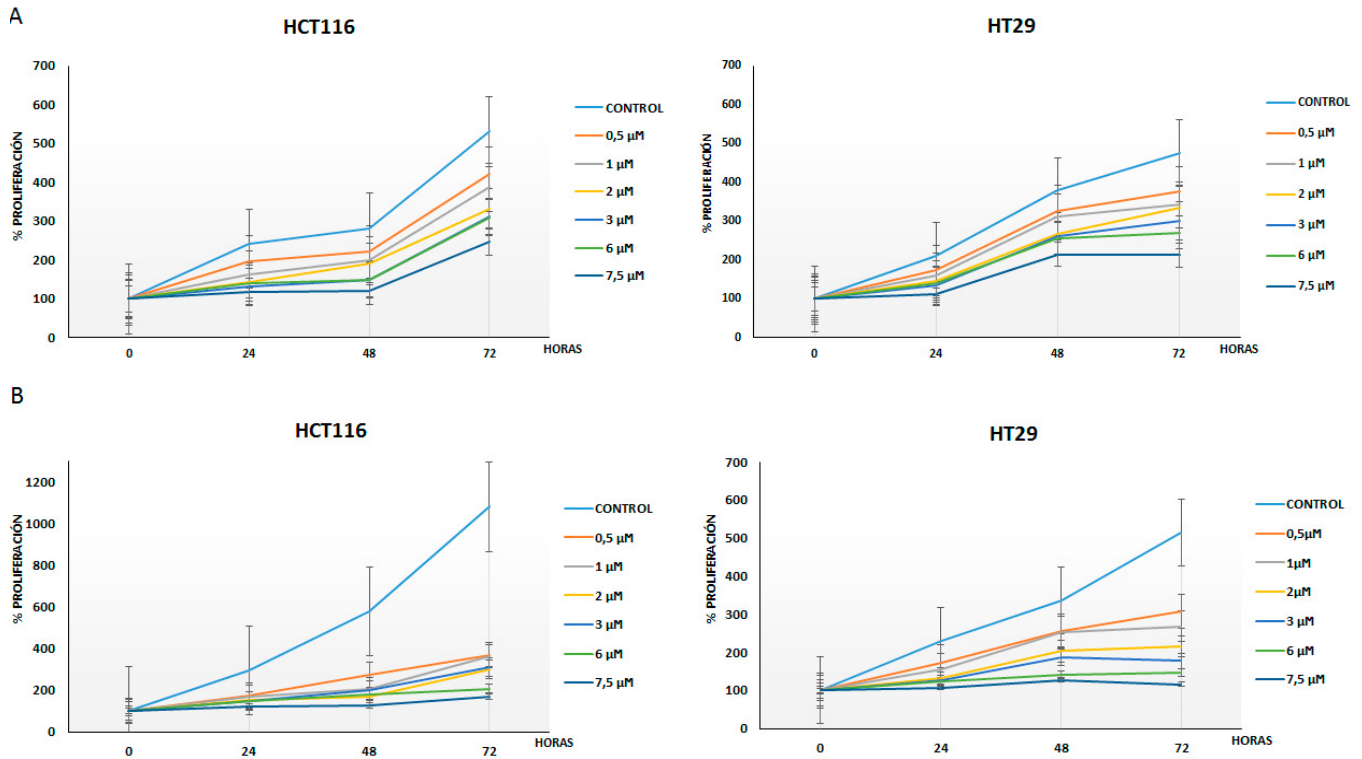


**Figura 52. El tratamiento conjunto de metformina y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu\text{M}$  y metformina a 8 mM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios anti-p62 Abcam® (ab109012) y anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

## 4.2 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO DECITABINA® EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO

Para evaluar si la Decitabina® (5-aza-2'-desoxicitidina) generaba un efecto en la proliferación y supervivencia de las líneas tumorales HCT116 y HT29 se realizaron ensayos de viabilidad usando las concentraciones de 0,5, 1, 2, 3, 6 y 7,5  $\mu\text{M}$  de este fármaco cada 24 horas durante un máximo de 72 horas (Figura 56A). Los resultados obtenidos en las dos líneas celulares mostraron una leve disminución de la viabilidad a medida que se utilizaban concentraciones crecientes del fármaco.

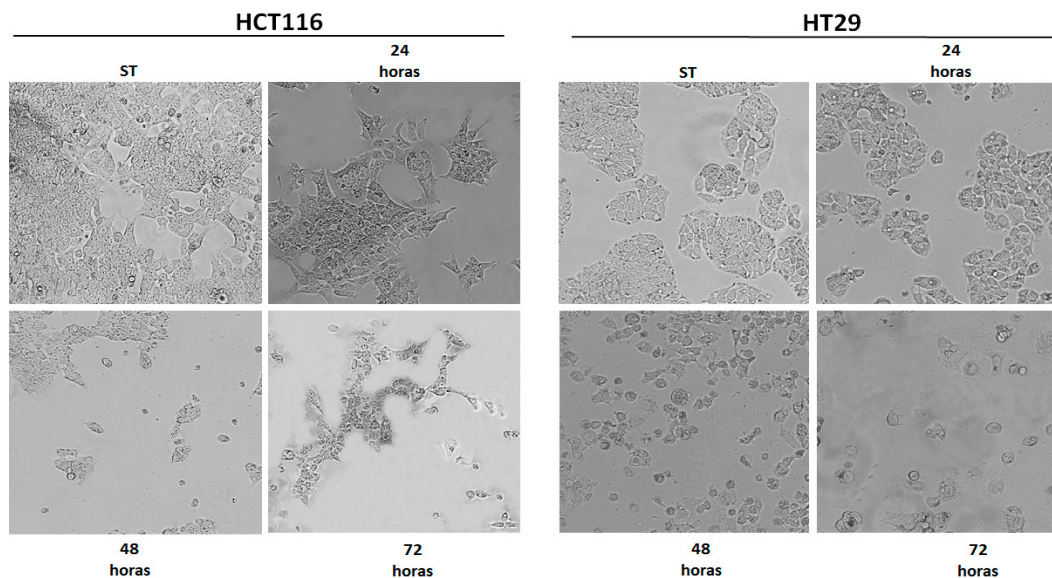
Posteriormente, se evaluó el efecto de la combinación del tratamiento con 5-aza-2'-desoxicitidina en presencia de DFO. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad utilizando las concentraciones anteriores, pero en presencia del quelante a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  (figura 53B). En todos los casos se observó que ambas líneas mostraban una mayor disminución de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de este fármaco. Tanto en la línea celular HT29 como en la línea HCT116 a partir de una concentración de 6  $\mu\text{M}$  del fármaco Decitabina® se observó que la proliferación fue considerablemente menor. Por ello, seleccionamos la concentración de 6  $\mu\text{M}$  para analizar el efecto en la expresión de proteínas en ambas líneas celulares, así como su morfología.



**Figura 53. El tratamiento combinado de Decitabina® y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. A)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento único con Decitabina® durante 72 horas a diferentes concentraciones. **B)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento combinado con Decitabina® y DFO. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes.

Con el fin de observar si ocurría un cambio en la morfología celular con el tratamiento conjunto DFO y Decitabina® se analizaron imágenes obtenidas mediante un microscopio óptico al exponer a los cultivos celulares al quelante con el fármaco a una concentración de 6 μM cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

El análisis de la morfología celular de las dos líneas tumorales mostró que al pasar las 48 horas en la línea HCT116 se observaba la presencia de prolongaciones finas y extensión del citoplasma, mientras que, en las células HT29 se observaron prolongaciones más engrosadas y la pérdida de su morfología hexagonal. Por último, a las 72 horas había mayor cantidad de células muertas en la línea HT29 que en la línea HCT116 (figura 54).



**Figura 54.** El tratamiento conjunto Decitabina®-DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR. Las imágenes muestran el cambio de la morfología celular durante 72 horas de tratamiento

#### 4.2.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN LÍNEAS TUMORALES DE CCR TRATADAS CON DECITABINA® Y DFO

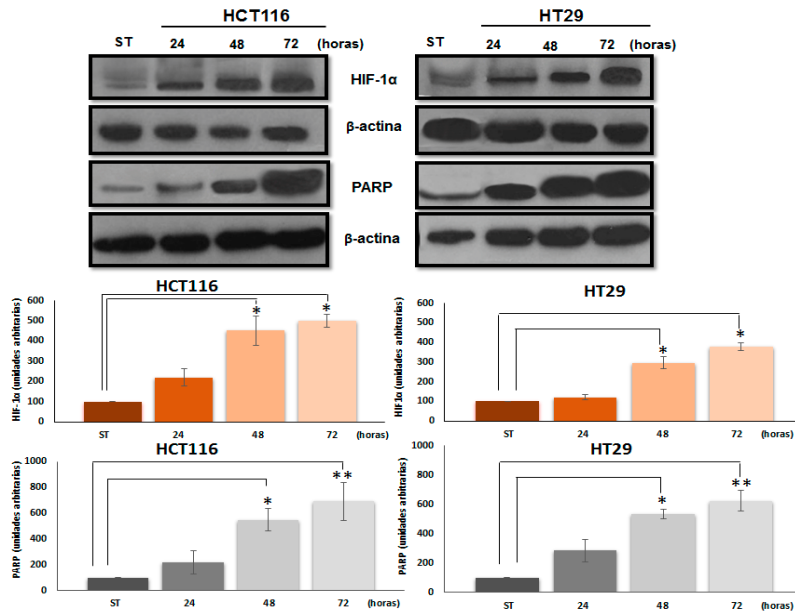
Con el fin de analizar si el tratamiento con Decitabina® generaba un cambio en la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , las células fueron tratadas con el fármaco a concentración 6  $\mu$ M y en presencia de DFO durante 24, 48 y 72 horas, además, para analizar si ocurría variación en la muerte celular debido al tratamiento se evaluó la expresión de la proteína PARP en los mismos rangos de tiempo.

El estudio de la expresión de HIF-1 $\alpha$  mostró un aumento progresivo tras 72 horas de tratamiento en las dos líneas celulares (figura 55A). Los resultados de la cuantificación indicaron que a partir de las 48 horas en tratamiento el aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue estadísticamente significativo en las dos líneas tumorales (figura 55A). Al realizar el estudio de la proteína PARP se observó que en las dos líneas celulares aumentó significativamente su expresión a partir de las 48 horas de tratamiento, lo cual progresó significativamente al pasar las 72 horas (figura 55A).

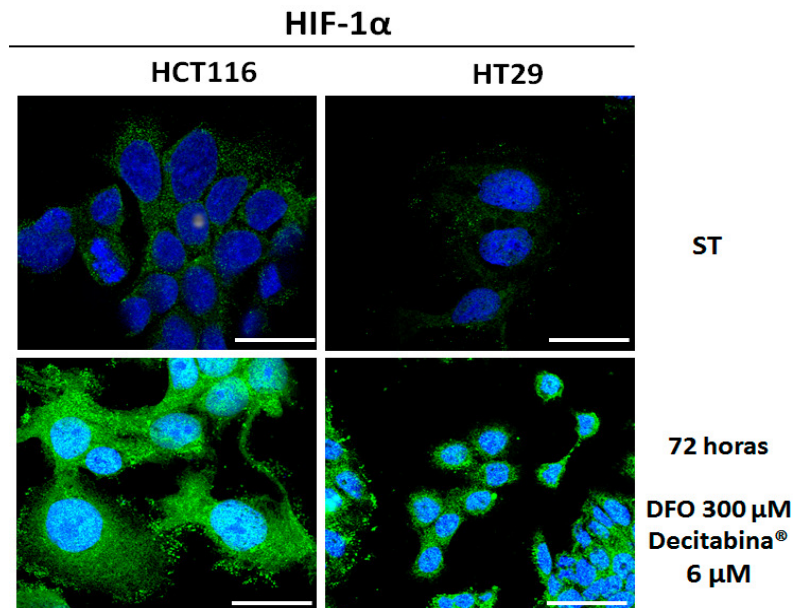
Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el fin de corroborar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  y observar su localización. Estos ensayos se realizaron tras 72 horas de tratamiento con DFO y Decitabina®.

En la figura 55B se muestran imágenes de las inmunofluorescencias realizadas bajo las condiciones descritas anteriormente. Las células en normoxia (ST) mostraron baja expresión de HIF-1 $\alpha$ , la cual se ubica en el citoplasma exclusivamente. Sin embargo, en las imágenes de los cultivos en tratamiento se pudo observar que esta proteína se acumulaba tanto en el citoplasma como en los núcleos de las células (figura 55B).

**A**



**B**



**Figura 55. El tratamiento Decitabina®-DFO incrementa la expresión de HIF-1α en líneas celulares de CCR. A)** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO a 300 μM y 5-aza-2'-desoxicitidina a 6 μM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \*p < 0,05 y \*\*p < 0,01 vs control (ST). **B)** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300 μM y Decitabina® a 6 μM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1α se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1α Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

#### **4.2.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO Y DECITABINA®**

Para analizar el efecto de la Decitabina® sobre la autofagia en condiciones hipóxicas se evaluó la expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3, mTOR, p62, LC3BI/II, y ATG5 en las líneas celulares HCT116 y HT29 tratadas con el fármaco a una concentración de 6  $\mu$ M en presencia de DFO durante 24, 48 y 72 horas.

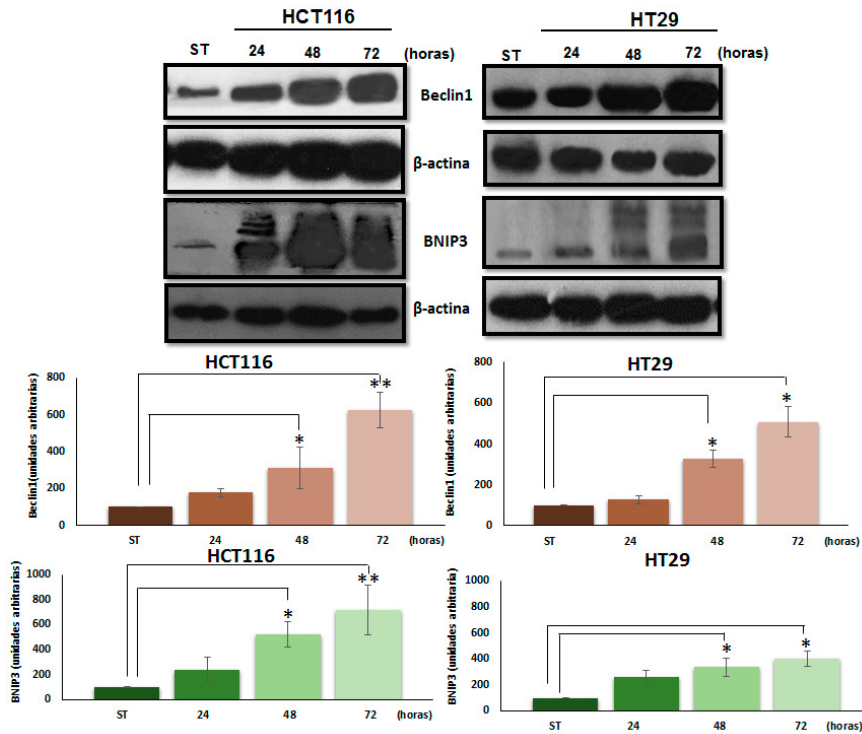
El estudio de expresión de Beclin1 mostró que a partir de las 24 horas hay un aumento evidente en la línea HCT116, mientras que en la línea HT29 la expresión se mantuvo prácticamente igual a la observadas al inicio del tratamiento. Sin embargo, la cuantificación de la expresión mostraba que en las dos líneas celulares hubo un aumento de la expresión significativo a partir de las 48 horas, el cual incrementó significativamente en la línea HCT116 tras 72 horas de tratamiento (figura 56A).

El estudio de expresión de BNIP3 mostró que en las dos líneas celulares hubo un aumento de expresión dependiente del tiempo de tratamiento (figura 56A). La cuantificación reflejó que la línea HCT116 mostraba el doble de expresión de BNIP3 comparada con la línea HT29. Sin embargo, el aumento en la expresión de dicha proteína en la línea HT29 fue estadísticamente significativo a partir de las 48 horas (figura 56A).

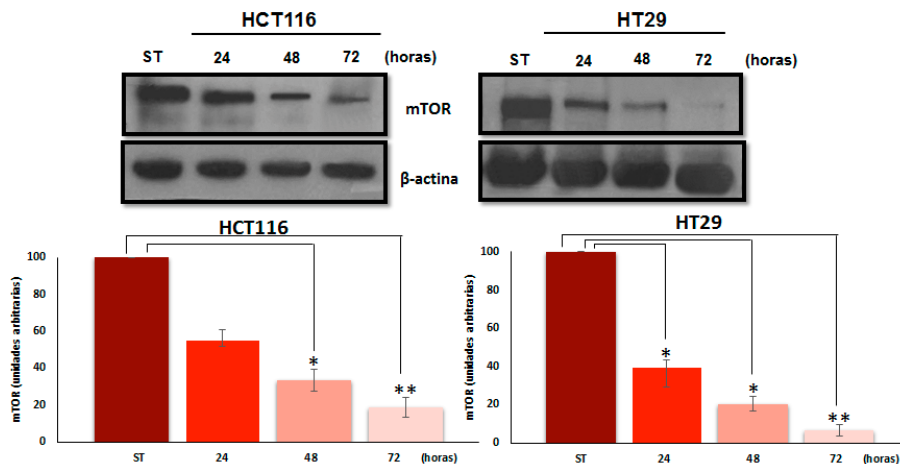
En el caso del estudio de la proteína mTOR, se observó la disminución progresiva de su expresión en las dos líneas celulares (figura 56B). Los resultados de la cuantificación mostraron que en la línea HCT116 la disminución de la expresión de mTOR fue estadísticamente significativa a partir de las 48 horas de tratamiento, mientras que en la línea HT29 fue a partir de las 24 horas, además, tras 72 horas la expresión de la proteína fue casi nula en la línea HT29 (figura 56B).



**A**



**B**



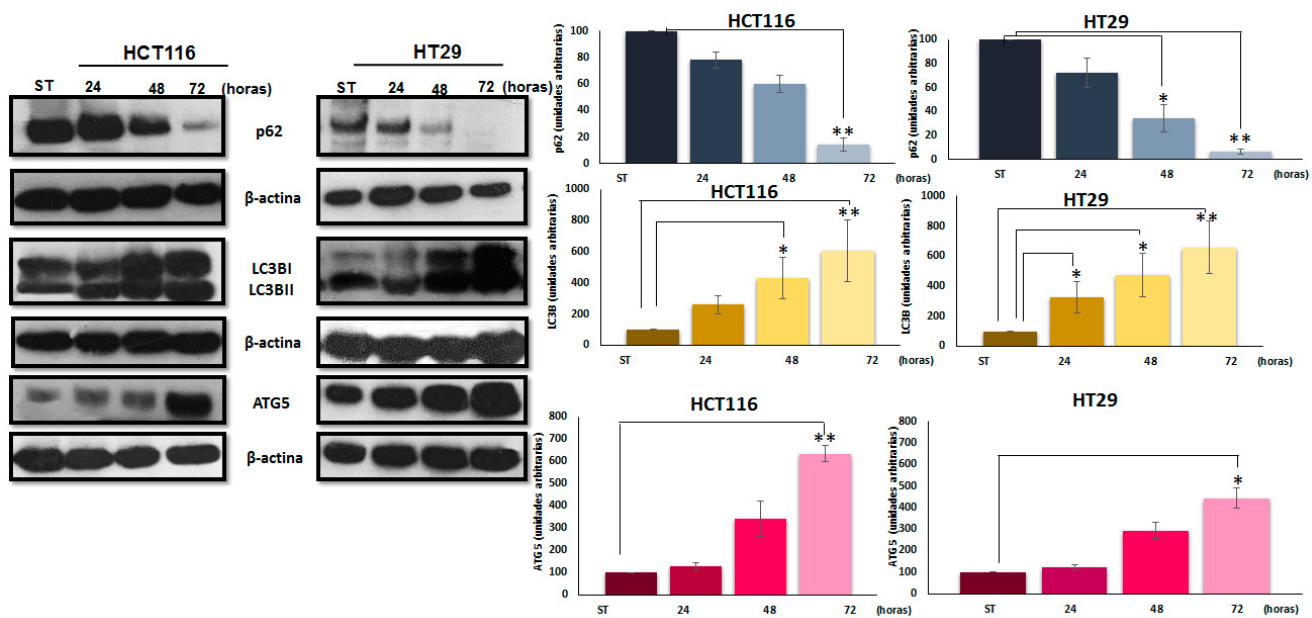
**Figura 56. Expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3 y mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y Decitabina®.** **A)** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300 μM y Decitabina® a 6 μM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST). **B)** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300 μM y Decitabina® a 6 μM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la

proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST)

Al analizar la expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5, observamos que la proteína p62 en la línea HCT116 presentó un leve aumento de la expresión a las 24 horas de tratamiento y posteriormente disminuyó hasta inhibirse casi totalmente. Por su parte, en la línea HT29 la expresión de p62 fue disminuyendo significativamente hasta la inhibición total de la misma a las 72 horas (figura 57).

La expresión de las isoformas LC3BI/II ocurría de forma dependiente al tiempo de exposición de las células al tratamiento (figura 57). Sin embargo, en la línea HCT116 el aumento fue significativo a partir de las 48 horas bajo mientras que en la línea HT29 fue a partir de las 24 horas (figura 57).

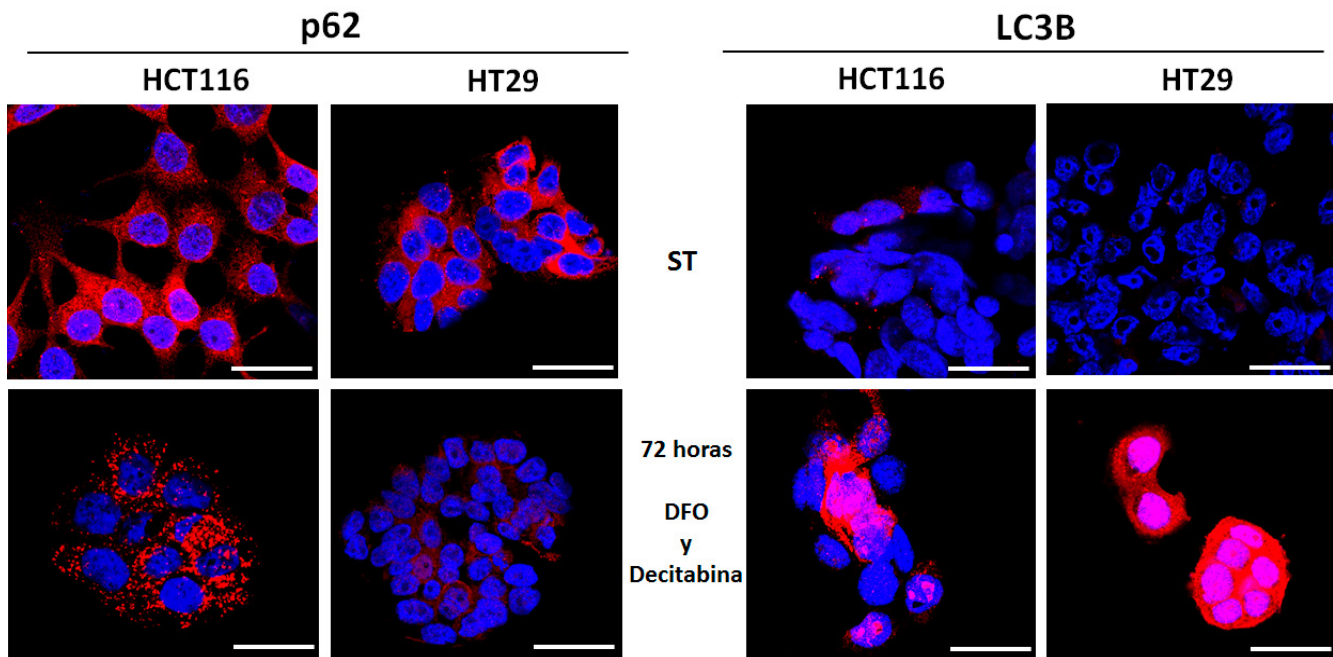
Por último, se analizó la variación de la expresión de la proteína ATG5. Como se puede observar en la figura 57, el aumento de la expresión de esta proteína en las dos líneas celulares fue progresivo. En las gráficas se refleja que el aumento observado en las dos líneas celulares fue significativo tras 72 horas de tratamiento.



**Figura 57. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y Decitabina®.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300  $\mu\text{M}$  de DFO y 6  $\mu\text{M}$  de Decitabina®. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales para analizar la expresión y localización de las proteínas p62 y LC3B. Estos ensayos se realizaron una vez que las líneas celulares permanecieran 72 horas tratadas con Decitabina® y en presencia de DFO.

En la figura 58 se pudo apreciar que en las dos líneas tumorales en normoxia (ST) la expresión de p62 fue mayoritariamente en todo el citoplasma y en algunas células en el núcleo. En los cultivos en tratamiento se observó la inhibición total de su expresión en algunas células y en otras una leve acumulación alrededor del núcleo. En el caso de la proteína LC3B, la expresión fue casi nula en las células que permanecieron en normoxia (ST). Por su parte, en las células tratadas, la expresión de LC3B aumentó considerablemente (figura 68). En estas se observó acumulación principalmente en el citoplasma y en el núcleo (figura 58).



**Figura 58. El tratamiento conjunto de Decitabina® y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y Decitabina a 6  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

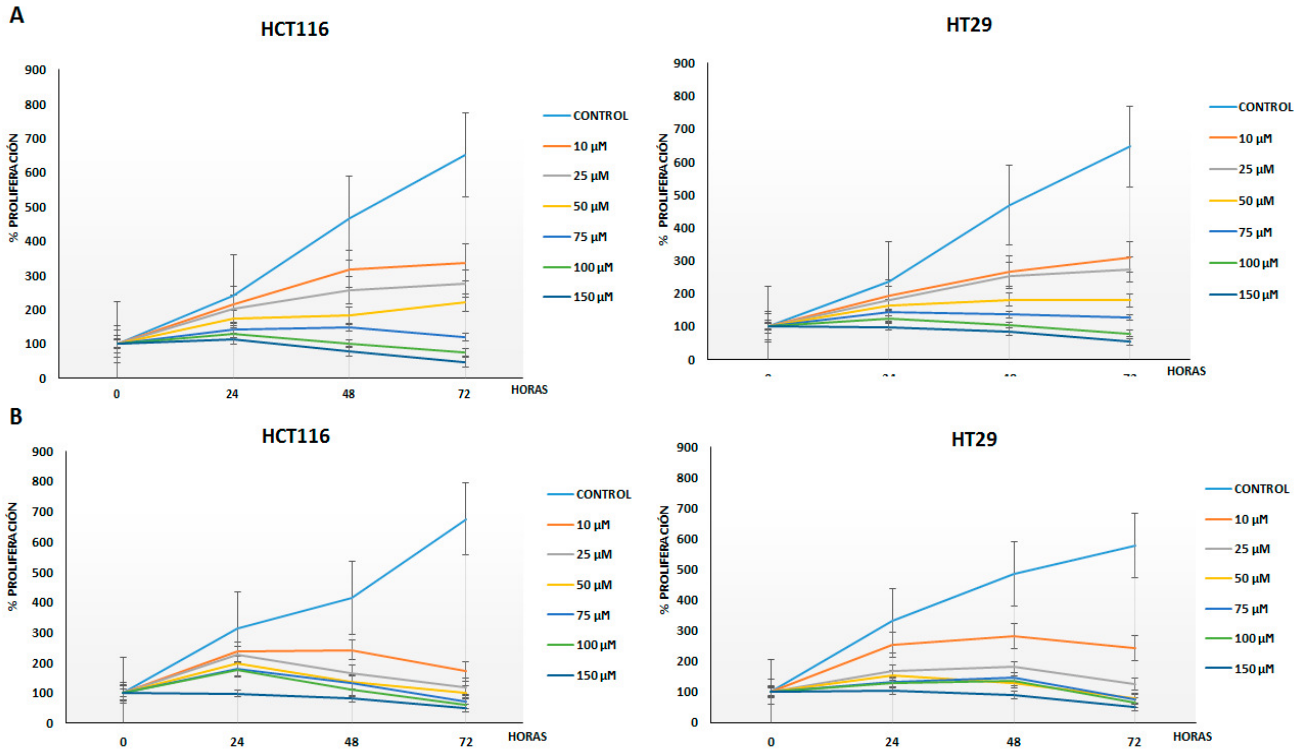
### **4.3 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO CLOROQUINA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO**

Las líneas celulares derivadas de CCR (HCT116 y HT29) se incubaron al tratamiento con el fármaco inhibidor de la autofagia, cloroquina. El crecimiento y la supervivencia celular en respuesta al tratamiento único con este fármaco se evaluó mediante ensayos de viabilidad usando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$  cada 24 horas durante un máximo de 72 horas (figura 59A).

Al analizar los resultados obtenidos se pudo observar que la proliferación en ambas líneas celulares disminuye de forma dependiente al aumento de la concentración de cloroquina. Además, se apreció que la concentración a la cual disminuye mayormente la proliferación celular en las dos líneas tumorales fue a 75  $\mu\text{M}$ .

Posteriormente, se evaluó el efecto de la combinación del tratamiento con cloroquina en presencia de DFO. Para esto, se realizaron ensayos de viabilidad utilizando las mismas concentraciones que en el ensayo anterior, pero en presencia de DFO a una concentración de 300  $\mu\text{M}$  (figura 59B).

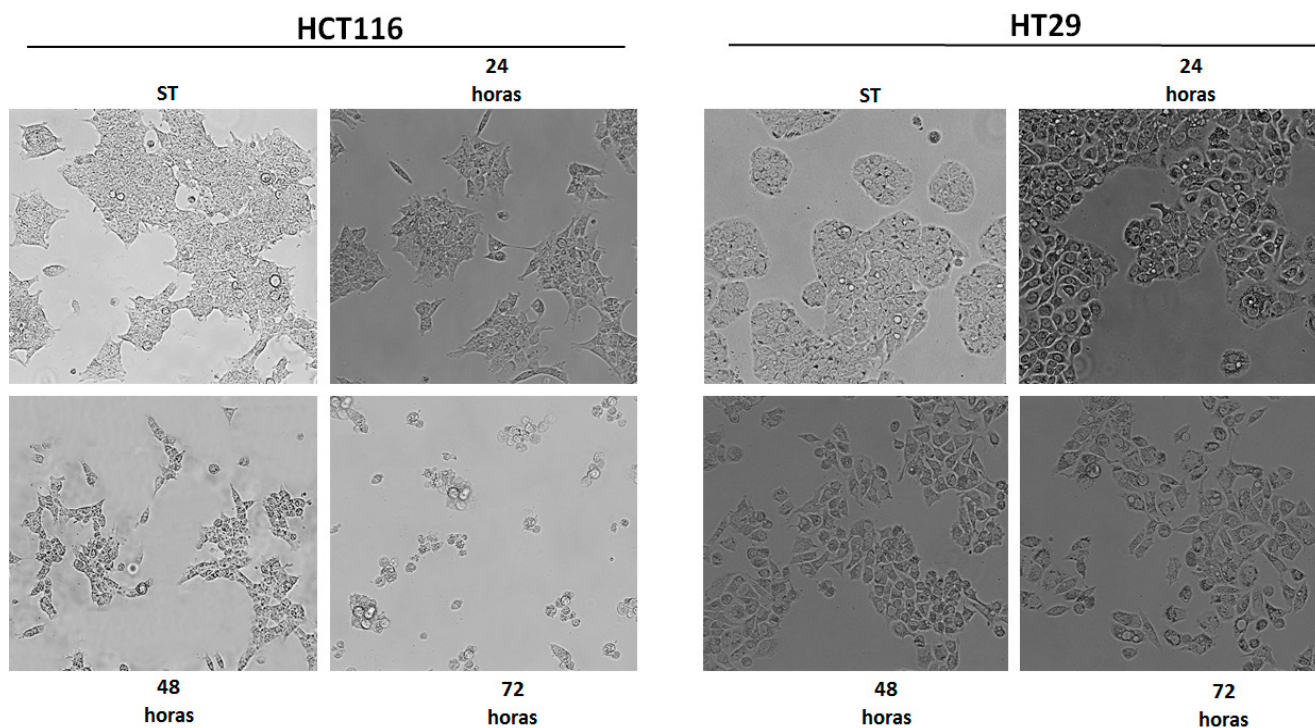
En todos los casos se observó que ambas líneas mostraron mayor disminución de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de este fármaco con respecto a los ensayos anteriores. Es importante destacar que a partir de 25  $\mu\text{M}$  no se observó proliferación celular en las dos líneas tumorales. Es por ello que se seleccionó esta concentración para analizar el efecto de este tratamiento en la morfología celular, expresión de proteínas de respuesta a hipoxia y en el proceso de autofagia.



**Figura 59. El tratamiento combinado de cloroquina y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. A)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento único con cloroquina durante 72 horas a diferentes concentraciones. **B)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento combinado con cloroquina y DFO. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes.

Con el fin de observar si ocurría un cambio en la morfología celular con el tratamiento combinado cloroquina y DFO analizamos imágenes mediante un microscopio óptico a los cultivos que fueron expuestos a DFO y tratados con el fármaco a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

Al comparar las imágenes obtenidas en aquellos cultivos que permanecieron en normoxia con aquellas tomadas a las 24 horas se pudo apreciar que en la línea celular HCT116 presentó diferentes características como la presencia de finas prolongaciones, extensión del citoplasma, y vesículas muy pequeñas dentro de las células (figura 60). Por su parte, la línea celular HT29 presentó otros rasgos diferentes como la pérdida de su morfología hexagonal, prolongaciones del citoplasma más gruesas que las observadas en la línea HCT116 y múltiples vesículas en el citoplasma celular. Estas características se mantuvieron al pasar las 48 horas de tratamiento. Sin embargo, a las 72 horas la cantidad de células en las dos líneas fue menor a la observada al inicio, observándose mayor cantidad de células muertas en la línea HCT116 que en la línea HT29. Por último, en la línea HT29 se observaron prolongaciones citoplasmáticas más finas que las observadas a las 48 horas de tratamiento (figura 60).



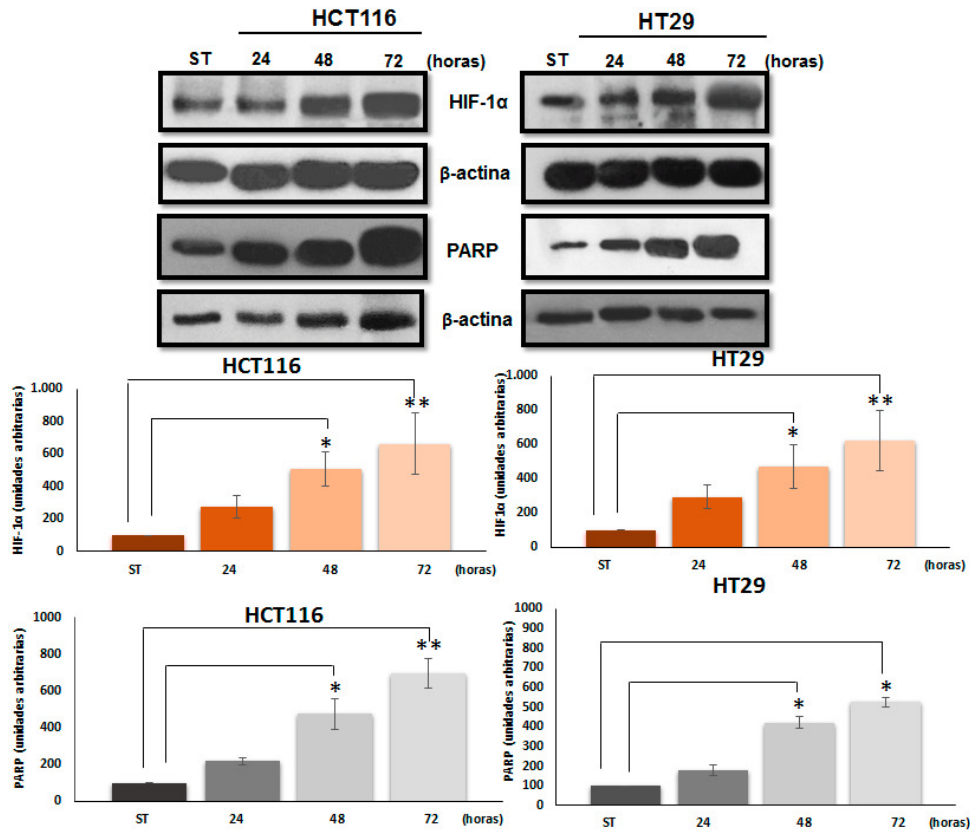
**Figura 60.** El tratamiento conjunto cloroquina y DFO genera cambios en la morfología celular en las líneas tumorales derivadas de CCR. Las imágenes muestran el cambio de la morfología celular durante 72 horas de tratamiento.

#### **4.3.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN LÍNEAS TUMORALES DE CCR TRATADAS CON CLOROQUINA Y DFO**

Para analizar si el efecto del tratamiento combinado de la cloroquina y DFO generaba un cambio en la proteína HIF-1 $\alpha$  se evaluó su expresión. Para ello, las células fueron tratadas con el fármaco a concentración de 25  $\mu$ M y en presencia de DFO durante 24, 48 y 72 horas. Además, para observar si ocurría variación en la muerte celular por el tratamiento se evaluó la expresión de la proteína PARP en los mismos rangos de tiempo.

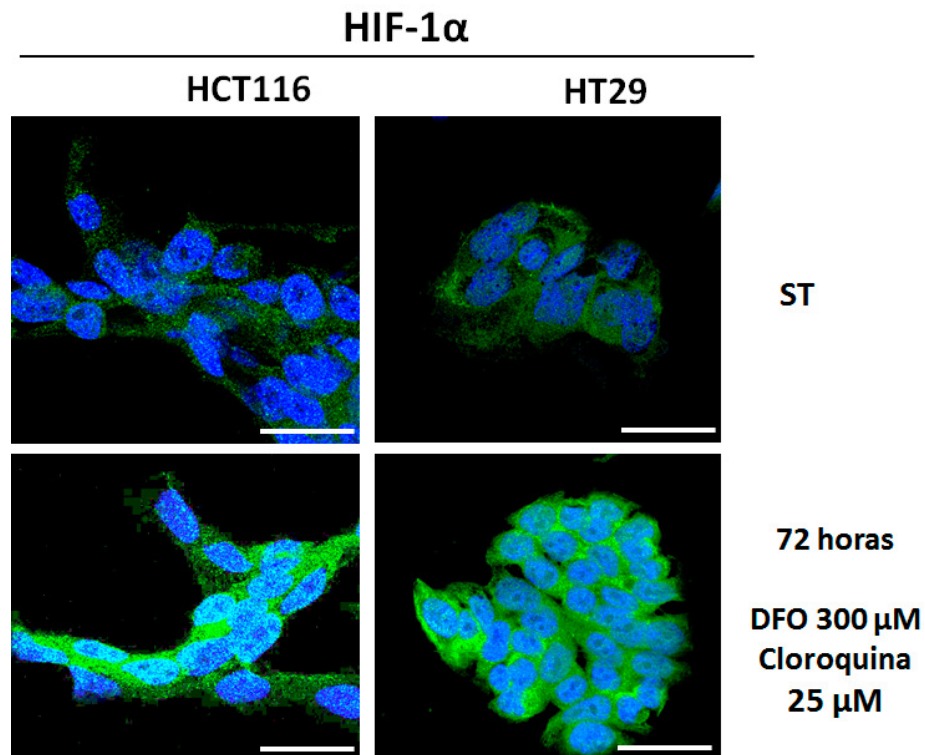
La expresión de HIF-1 $\alpha$  aumentó progresivamente transcurridas las 72 horas de tratamiento en la línea celular HT29, el cual fue significativo a partir de las 48 horas, mientras que en la línea celular HCT116 no se logró apreciar un cambio significativo hasta las 48 horas (figura 61).

Al evaluar la expresión de la proteína PARP se observó un aumento progresivo de la expresión hasta las 72 horas de tratamiento en las dos líneas celulares. Al cuantificar su expresión se pudo ver que el aumento fue significativo a partir de las 48 horas en las dos líneas celulares. Al pasar las 72 horas de tratamiento el incremento fue estadísticamente mayor en la línea HCT116 (figura 61).



**Figura 61. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO a 300 μM y cloroquina a 25 μM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa los valores de la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia con el fin de corroborar la expresión de la proteína HIF-1α y observar su localización. Estos ensayos se realizaron después de que los cultivos permanecieran 72 horas en presencia de DFO y bajo una concentración de 25 μM de cloroquina. En la figura 62 se muestran imágenes obtenidas de inmunofluorescencias en las cuales se observó que los cultivos que permanecieron en normoxia durante 72 horas la expresión de la proteína HIF-1α es baja. Sin embargo, en las imágenes obtenidas a partir de los cultivos en tratamiento hay mayor se aprecia mayor expresión de la proteína, la cual e acumula mayoritariamente en el citoplasma.



**Figura 62. El tratamiento cloroquina y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300  $\mu$ M y cloroquina a 25  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

#### 4.3.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO Y DECITABINA

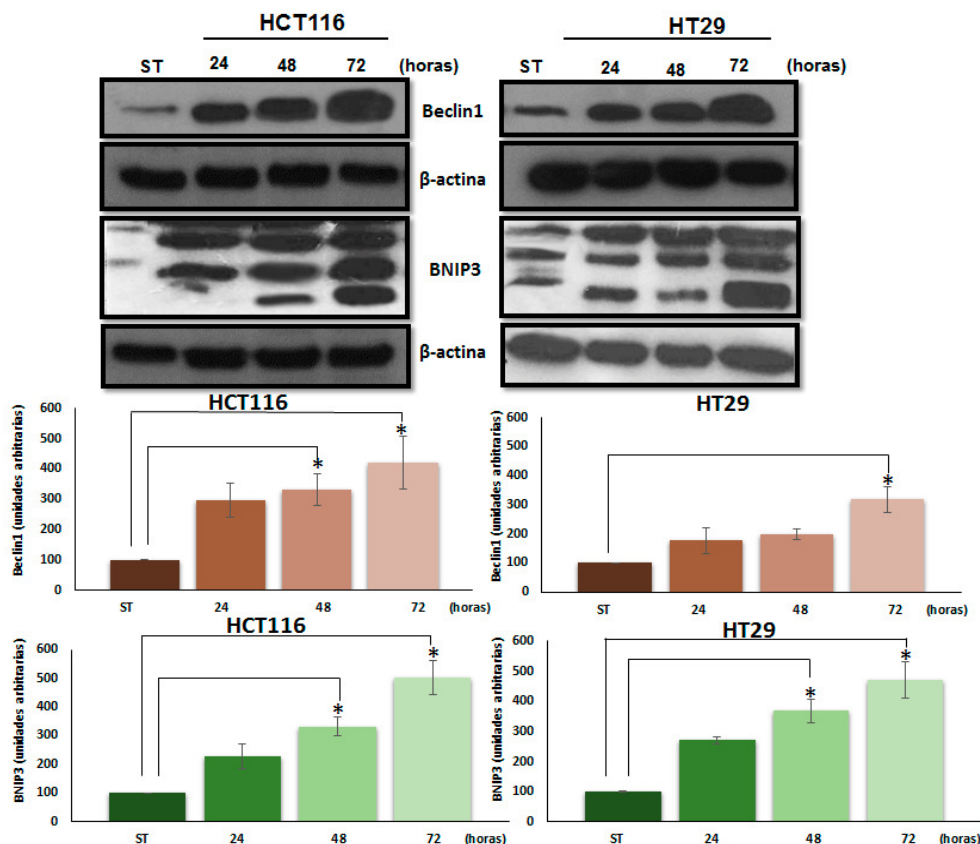
Para analizar el efecto de la cloroquina sobre la autofagia en condiciones hipóxicas se analizó la expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3, mTOR, p62, LC3B, y ATG5 en las líneas celulares HCT116 Y HT29 tratadas con el fármaco a 25  $\mu$ M y DFO a 300  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Además, se estudió por inmunofluorescencia la expresión y la localización de las proteínas p62 y LC3B.

El estudio de expresión de Beclin1 mostró que las dos líneas tumorales presentaban un aumento progresivo de la expresión de dicha proteína. La cuantificación de la expresión indicó que el aumento fue significativo a partir de las 48 de tratamiento en la línea HCT116, mientras que en la línea HT29 fue a las 72 horas (figura 63).

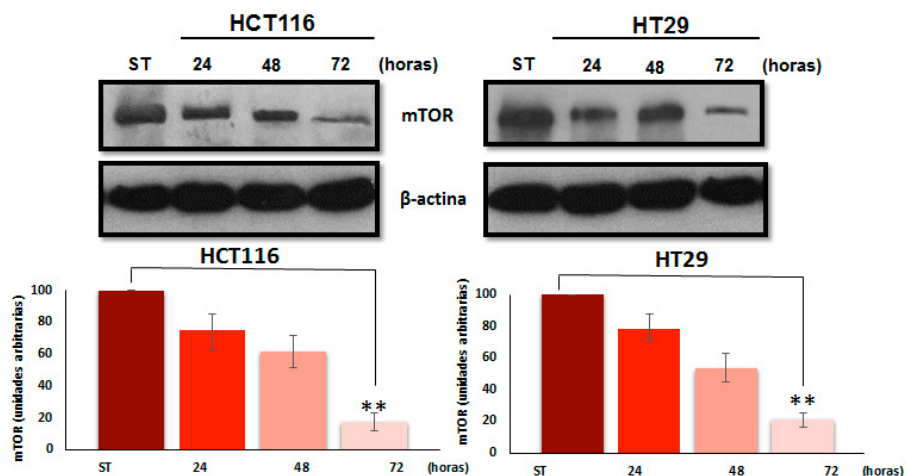
El estudio de la expresión de BNIP3 mostró que las dos líneas tumorales presentaban un aumento progresivo de la expresión de la proteína que solo fue significativo a partir de las 48 horas en tratamiento (figura 63).



En el caso del estudio de la proteína mTOR, se observó que no hubo disminución significativa de la expresión hasta las 72 horas de tratamiento en las dos líneas tumorales (figura 64)



**Figura 63. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y cloroquina.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y cloroquina a 25  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

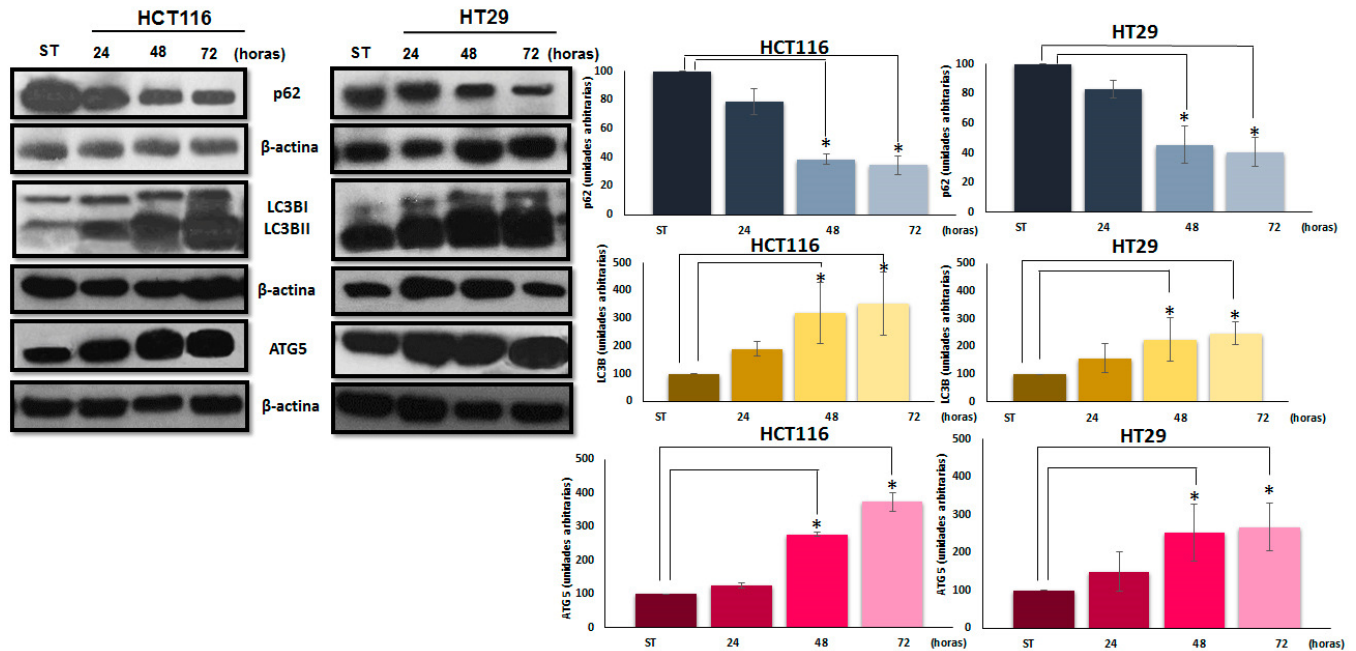


**Figura 64. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y cloroquina.** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y cloroquina a 25  $\mu$ M. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5. Los resultados obtenidos mediante western blot refleja que la expresión p62 disminuye significativamente a partir de las 48 horas de tratamiento en las dos líneas celulares (figura 65).

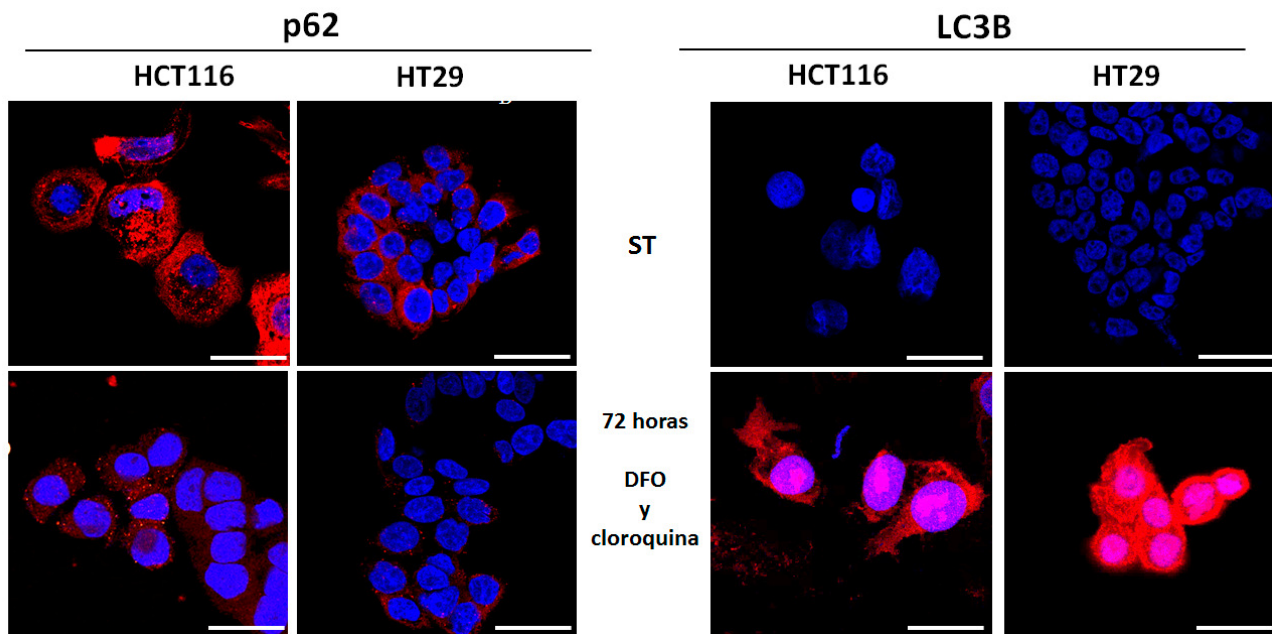
Los resultados obtenidos de la expresión de las isoformas LC3BI/II en las dos líneas tumorales evidenciaron el aumento de la expresión de la isoforma II de forma dependiente al tiempo de exposición de las células al tratamiento, mientras que la isoforma I no elevó considerablemente su expresión (figura 65). La cuantificación de la expresión de LC3B reflejó que en la línea HCT116 el aumento observado fue estadísticamente significativo a partir de las 24 horas, mientras que en la línea HT29 ocurrió a partir de las 48 horas de tratamiento (figura 65).

La expresión de la proteína ATG5 aumentó en las dos líneas celulares estudiadas a partir de las 24 horas bajo tratamiento, sin embargo, al transcurrir las 72 horas el aumento de su expresión fue considerablemente mayor. En las gráficas se refleja que el aumento de expresión observado fue estadísticamente significativo a partir de las 48 horas en las dos líneas tumorales (figura 65).



**Figura 65. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y cloroquina.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300 μM de DFO y 25 μM de cloroquina. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales para observar la expresión y localización de las proteínas p62 y LC3B al ser tratadas con cloroquina y DFO. Estos ensayos se realizaron después de que ambas líneas celulares permanecieran 72 horas en tratamiento.



**Figura 66. El tratamiento conjunto de cloroquina y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y cloroquina a 25  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

En la figura 66 se puede apreciar que en las dos líneas tumorales sin tratamiento la proteína p62 se localiza mayoritariamente en el citoplasma y en algunas células se observan acumulaciones en el núcleo. En las imágenes de las inmunofluorescencias de las células en tratamiento se pudo distinguir que la expresión de la proteína disminuye con respecto a las células no tratadas al pasar las 72 horas pero no es inhibida totalmente, además se observa acumulaciones en el citoplasma.

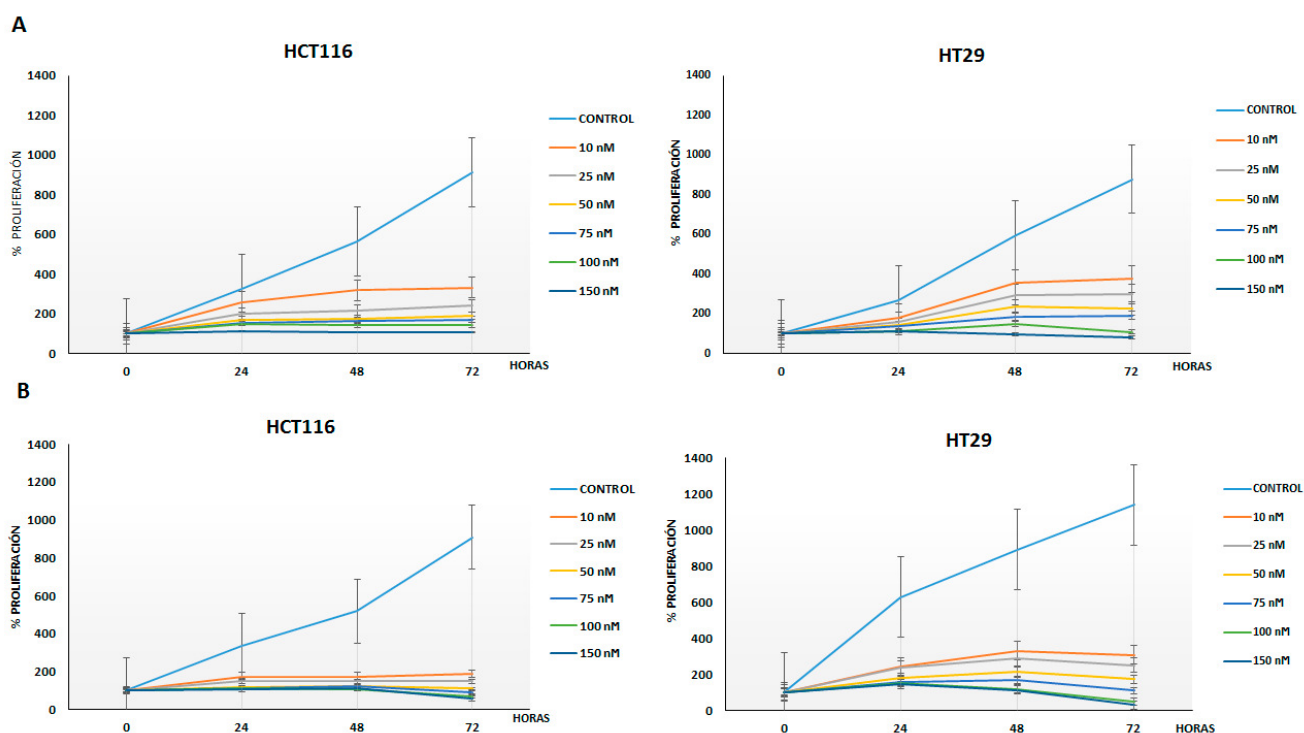
En el caso de las proteínas LC3BI/II, la expresión fue nula en las células que permanecieron en normoxia (figura 66). Por su parte, las células tratadas, la expresión de LC3BI/II aumentó considerablemente. En estas se observó acumulación de dicha proteína principalmente en el citoplasma y en algunas células en el núcleo (figura 66).

#### 4.4 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO PANOBINOSTAT® (LBH589) EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO

Para evaluar si el tratamiento con Panobinostat® (LBH589) generaba un efecto en la proliferación y supervivencia de las líneas tumorales HCT116 y HT29 se realizaron ensayos de viabilidad usando las concentraciones de 10, 25, 50, 75, 100 y 150 nM de este fármaco cada 24 horas durante un máximo de 72 horas.

Al analizar los resultados obtenidos se pudo observar que la proliferación de estas líneas celulares disminuye de forma dependiente al aumento de la concentración de Panobinostat®. Además, se pudo observar que en la línea tumoral HCT116 a partir de una concentración de 75 nM la proliferación celular fue mínima, mientras que en la línea HT29 fue a 100 nM (figura 67A).

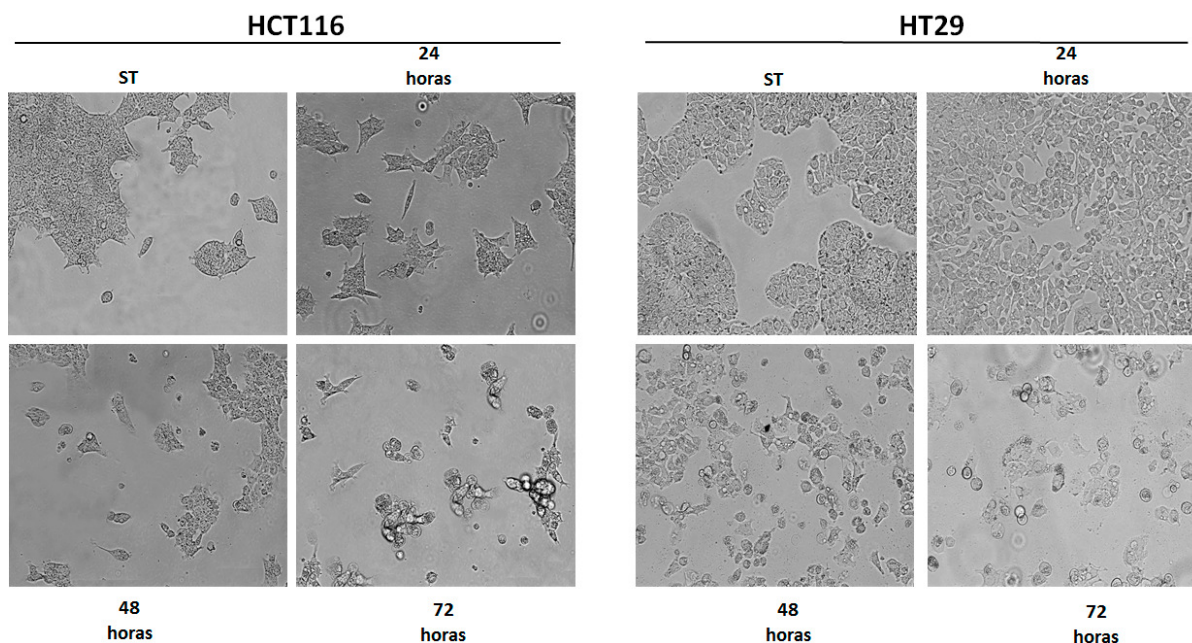
Posteriormente, se evaluó el efecto de la combinación del tratamiento con Panobinostat® y DFO. Para esto, se realizaron ensayos de viabilidad utilizando las mismas concentraciones del ensayo anterior, pero en presencia del quelante a una concentración de 300  $\mu$ M.



**Figura 67. El tratamiento combinado de LBH589 y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. A)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento único con LBH589 durante 72 horas a diferentes concentraciones. **B)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento combinado con LBH589 y DFO. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes

En todos los casos se observó que el tratamiento combinado generaba mayor disminución de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de Panobinostat®, observándose que a partir de 50 nM no había proliferación celular en las dos líneas tumorales (figura 67B). Es por ello que seleccionamos la concentración de 50 nM del fármaco para analizar el efecto en la morfología de las células, así como en la expresión de proteínas autofágicas y de respuesta a hipoxia.

Para observar si ocurría un cambio en la morfología celular al tratar las células con LBH589 y DFO se tomaron imágenes utilizando un microscopio óptico a los cultivos que fueron expuestos al quelante y tratados con el fármaco a una concentración de 50 nM cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.



**Figura 68. Células tumorales derivadas de CCR tratadas con los fármacos LBH589 y DFO.** Las fotografías muestran imágenes representativas obtenida a través de microscopía óptica cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

Al comparar las imágenes obtenidas al inicio del ensayo con aquellas tomadas cada 24 horas se pudo apreciar que se modifica la morfología celular en las dos líneas tumorales. Al pasar las 48 horas, se pudo apreciar que las células HCT116 presentaban prolongaciones finas, extensión del citoplasma y vesículas muy pequeñas dentro de las mismas, además, tras 72 horas de tratamiento se

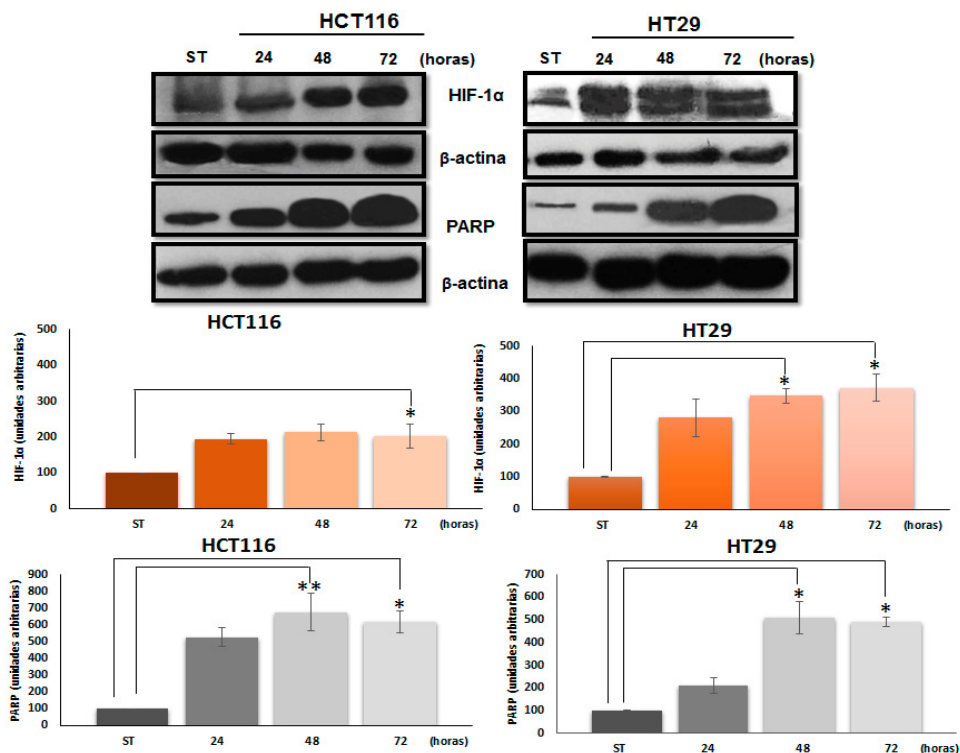
observó mayor cantidad de células muertas (figura 68). Por su parte, la línea celular HT29 a partir de las 24 horas presentó pérdida de su morfología hexagonal, prolongaciones del citoplasma más gruesas que las vistas en la línea HCT116 y múltiples vesículas en el citoplasma celular. Las características observadas en cada línea se mantuvieron al pasar las 48 horas de tratamiento, pero la cantidad de células fue menor. Al pasar las 72 horas, se observó mayor cantidad de células muertas en la línea HT29 que en la línea HCT116, además, las prolongaciones citoplasmáticas gruesas, que se observaron en la línea HT29 se tornaron más finas, semejantes a las observadas en la línea HCT116 (figura 68).

#### **4.4.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN LÍNEAS TUMORALES DE CCR TRATADAS CON PANOBINOSTAT® (LBH589) Y DFO**

Para analizar si el efecto del tratamiento con Panobinostat® generaba un cambio en la proteína HIF-1 $\alpha$  se evaluó su expresión mediante western blot. Para ello, las células fueron tratadas con el fármaco a 50 nM y en presencia de DFO durante 24, 48 y 72 horas. Para observar si ocurría variación en la muerte celular por el tratamiento, se estudió la expresión de la proteína PARP en los mismos rangos de tiempo.

La expresión de HIF-1 $\alpha$  en la línea HCT116 no cambió hasta las 48 horas de tratamiento, donde se observó un aumento en la expresión de la proteína y fue significativamente mayor a las 72 horas. En la línea celular HT29, se pudo apreciar el aumento progresivo de la proteína durante todo el ensayo, el cual fue significativo a partir de las 48 horas de tratamiento (figura 69).

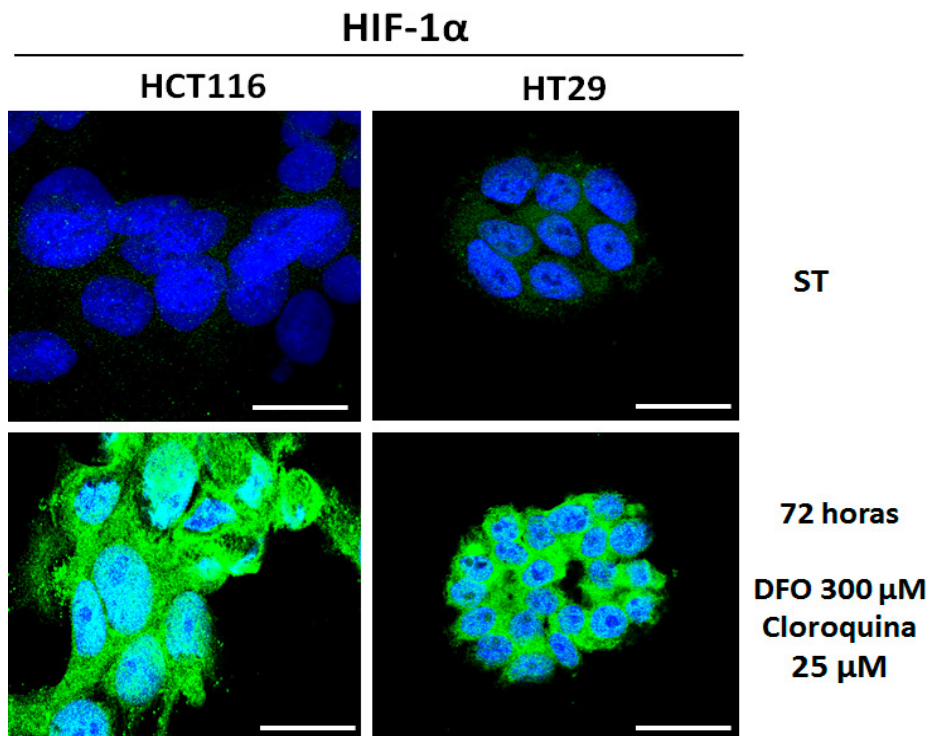
Al evaluar la expresión de la proteína PARP se observó que en las dos líneas celulares el incremento de esta proteína fue significativo a partir de las 48 horas de tratamiento (figura 69).



**Figura 69. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO a 300 μM y LBH589 a 50 nM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron después de que los cultivos permanecieran 72 horas en presencia de DFO y bajo una concentración de 50 nM de Panobinostat®.





**Figura 70. El tratamiento LBH589 y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300  $\mu$ M y LBH589 a 25  $\mu$ M. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

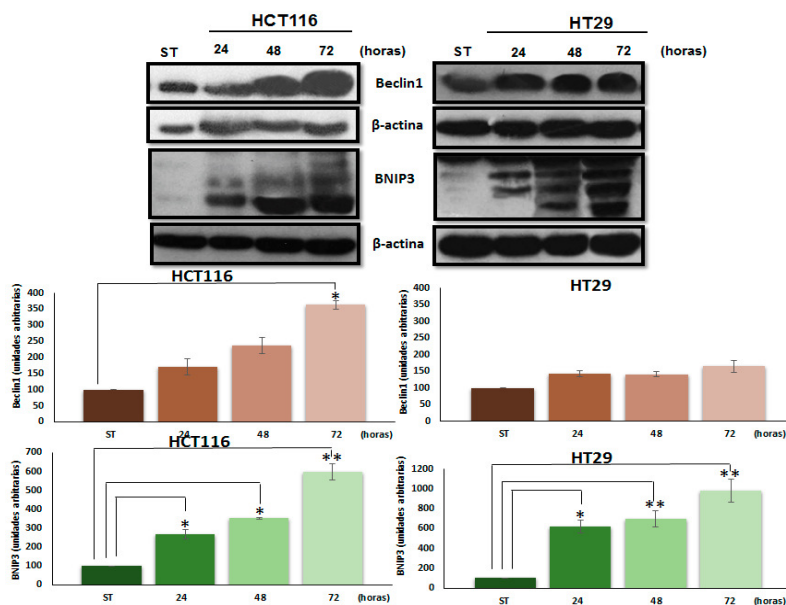
En la figura 70 se muestran imágenes de las dos líneas celulares que permanecieron en condiciones normales (ST) durante 72 horas, en estas se observa muy poca expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , la cual se encuentra ubicada exclusivamente en el citoplasma. En las imágenes obtenidas a partir de los cultivos en tratamiento se puede observar que en las dos líneas celulares la proteína se acumula de forma uniforme tanto en el citoplasma como en los núcleos de las células

#### 4.4.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS TUMORALES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO EN TRATAMIENTO CON PANOBINOSTAT®

Para analizar el efecto del tratamiento combinado entre el Panobinostat® y el DFO sobre la autofagia se estudió la expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3, mTOR, p62, LC3BI/II, y ATG5 en las líneas celulares HCT116 Y HT29 tratadas con DFO a 300  $\mu$ M y de dicho fármaco a 50 nM durante 24, 48 y 72 horas.

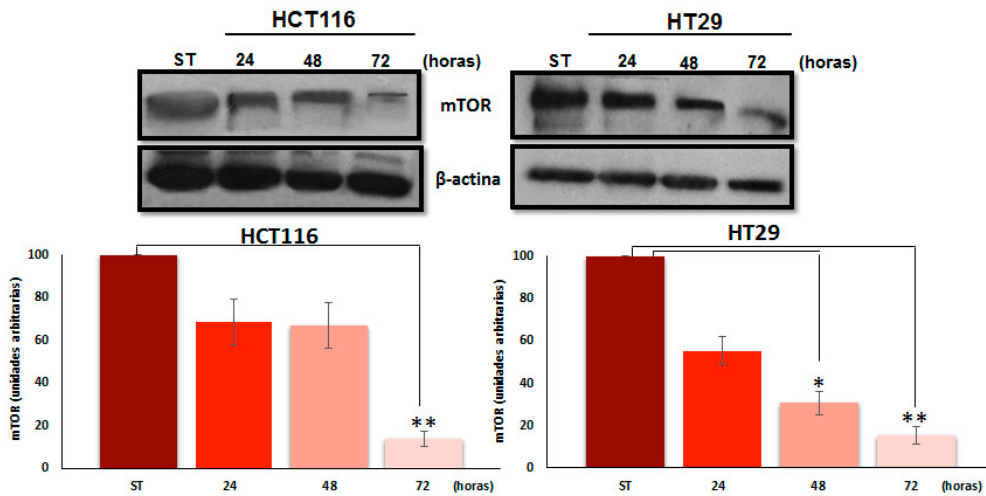
El estudio de expresión de Beclin1 mostró que en las dos líneas celulares no hubo variación significativa en la expresión de la proteína hasta las 48 horas de tratamiento. Sin embargo, en la línea HCT116 hubo mayor incremento a las 72 horas, mientras en la línea HT29 permaneció estable (figura 71).

Al evaluar la expresión de BNIP3 frente a este tratamiento se observó que las dos líneas tumorales presentaban un aumento progresivo de la expresión de la proteína. Es importante destacar que este incremento fue mucho mayor en la línea HT29 (figura 71). La cuantificación de la expresión reflejó que en las dos líneas celulares el incremento de la proteína fue estadísticamente significativo a partir de las 24 horas (figura 71).



**Figura 71. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y LBH589.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y LBH589 a 50 nM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Al evaluar la expresión de la proteína mTOR se observó que en la línea HCT116 no hubo variación significativa hasta pasar las 72 horas bajo tratamiento, mientras que en la línea HT29 disminuyó progresivamente durante todo el ensayo, lo cual fue significativo a partir de las 48 horas de tratamiento (figura 72).

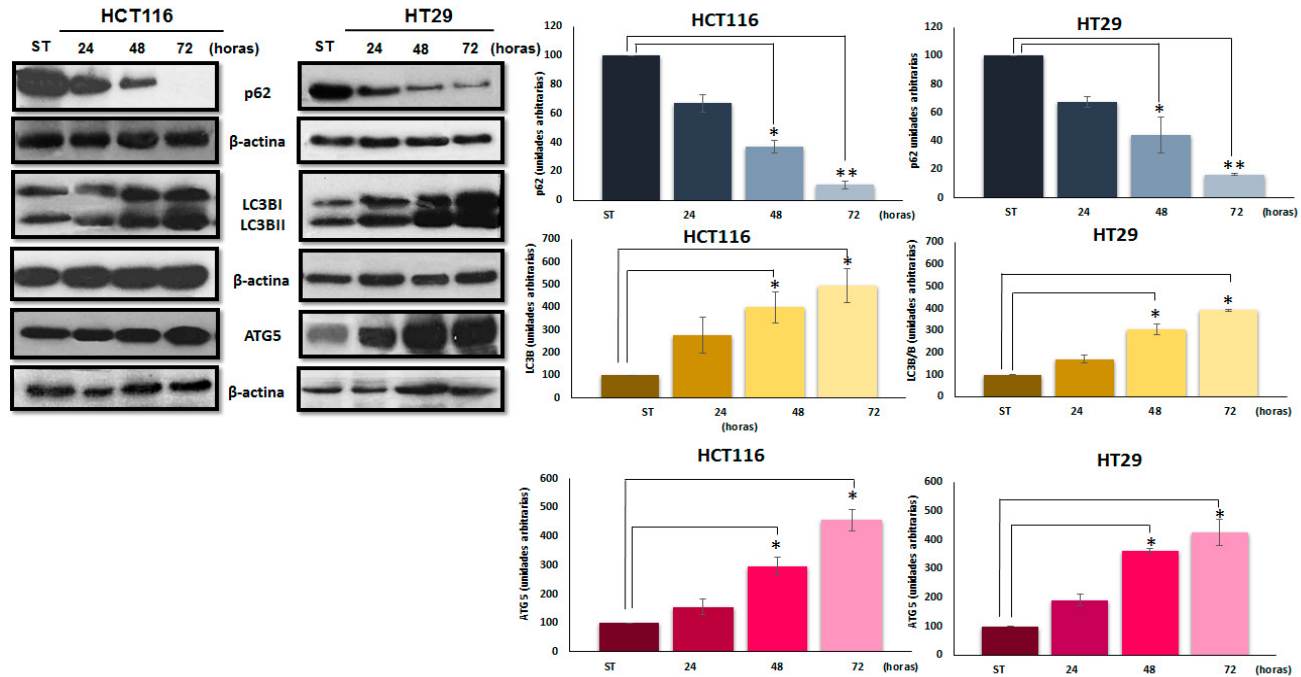


**Figura 72. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y LBH589.** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y a LBH589 a 50 nM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se evaluó la expresión de las proteínas p62, LC3BI/II y ATG5. Los resultados obtenidos reflejaron que la proteína p62 en la línea HCT116 no presento variación hasta las 72 horas en tratamiento, cuando se observó la disminución significativa de la expresión de la proteína. Sin embargo, en la línea HT29 la expresión de esta proteína disminuyó progresivamente hasta culminar las 72 horas en tratamiento, lo cual fue significativo a partir de las 48 horas (figura 82).

Luego se evaluó la variación de la expresión de las proteínas LC3BI/II. Los resultados reflejaron que el aumento de la expresión ocurría de forma dependiente al tiempo de exposición de las células al tratamiento. No obstante, en la línea HCT116 se observó el aumento en la expresión de las dos isoformas, mientras que en la línea HT29 se observó la disminución en la expresión de la isoforma LC3BI y el aumento de LC3BII (figura 73). Al analizar la cuantificación proteica se pudo observar que el aumento en la expresión de LC3B fue estadísticamente significativo a partir de las 24 horas en la línea HCT116, mientras que en la línea HT29 fue a partir de las 48 horas. (figura 73).

Por último, se analizó la variación de la expresión de la proteína ATG5 y se observó que el incremento de esta proteína en las dos líneas celulares fue a partir de las 24 horas de tratamiento, lo cual fue significativo a partir de las 48 horas (figura 73).



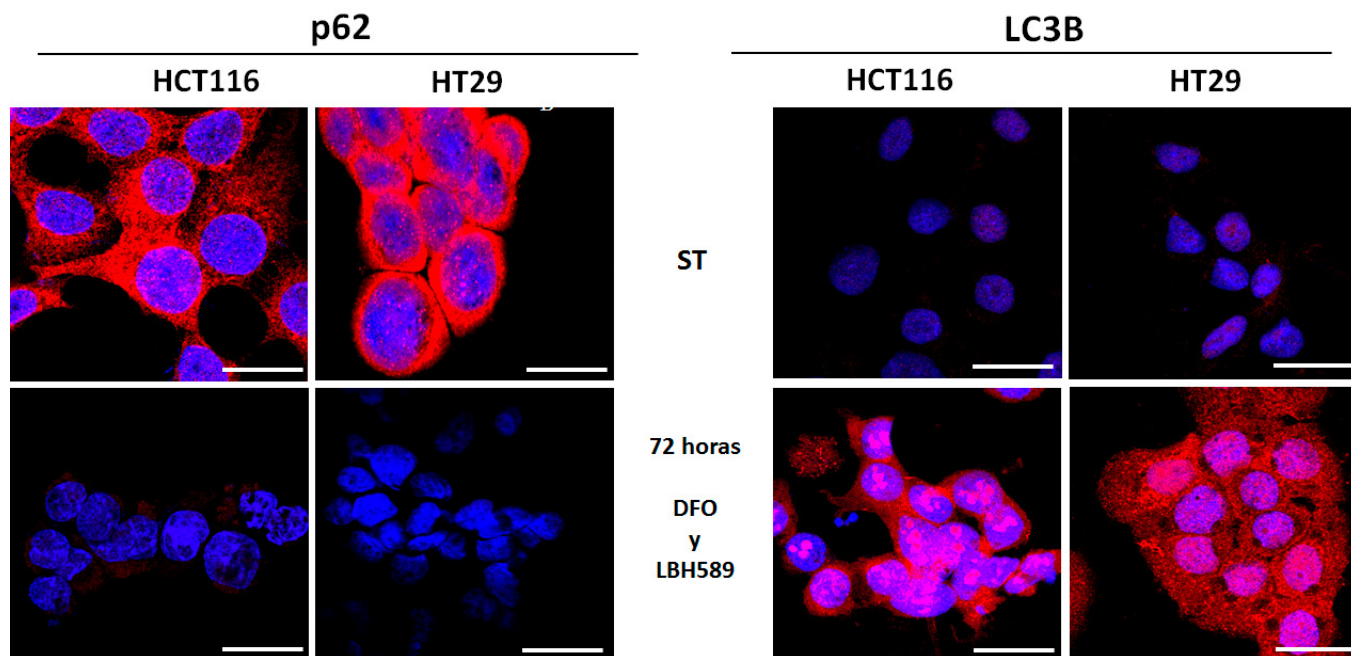
**Figura 73. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y LBH589.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300 μM de DFO y 50 nM de LBH589. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales con el fin de analizar la expresión y localización de las proteínas p62 y LC3B al ser tratadas con Panobinostat® a 50 nM y DFO a 300μM. Estos ensayos se realizaron una vez que las líneas células permanecieran 72 horas tratadas con estos dos fármacos.

En la figura 74 se pudo apreciar que en las imágenes de inmunofluorescencia la expresión de p62 fue en todo el citoplasma en las dos líneas tumorales sin tratamiento, sin embargo, en las imágenes de las células tratadas durante 72 horas la expresión de la proteína fue mucho menor en las dos líneas tumorales, solo se pudo diferenciar pequeñas acumulaciones de p62 alrededor del núcleo en algunas células.

En el caso de las proteínas LC3B/I/II, no se observó expresión de las isoformas en la mayoría de las células que permanecieron en condiciones normales, mientras que, en las células expuestas al

tratamiento, la expresión de LC3BI/II aumentó de forma significativa y se observó principalmente en el citoplasma (figura 83).



**Figura 74. El tratamiento conjunto de LBH589 y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y LBH589 a 50 nM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

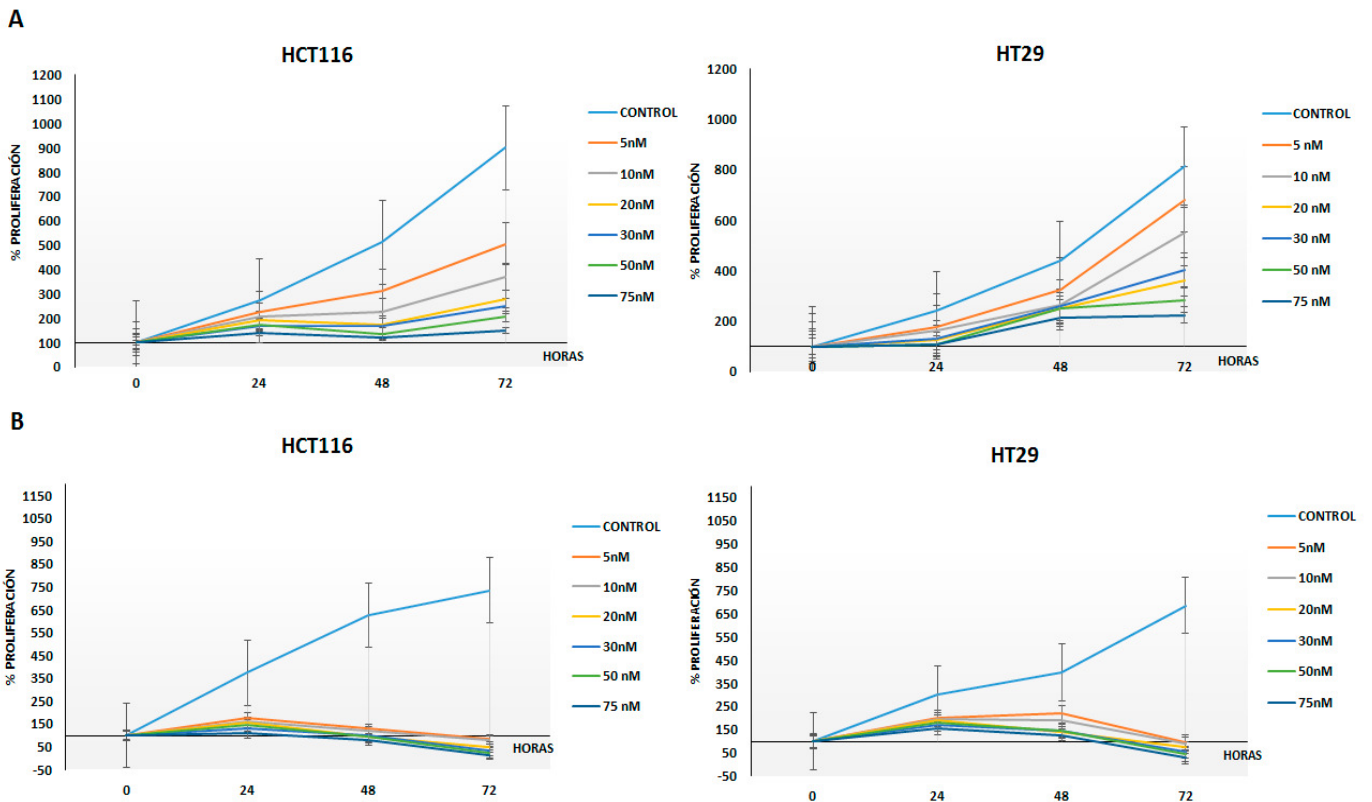
#### 4.5 CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO DEL FÁRMACO PACLITAXEL EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO

Para evaluar si el fármaco paclitaxel generaba un efecto en la proliferación celular en las líneas tumorales HCT116 y HT29 se realizaron ensayos de viabilidad usando las concentraciones de 5, 10, 20, 30, 50 y 75 nM cada 24 horas durante un máximo de 72 horas (figura 75).

Al analizar los resultados se observó que en las dos líneas tumorales disminuía la proliferación celular a medida que se utilizaban concentraciones crecientes del fármaco.

Posteriormente, se evaluó el efecto de la combinación del tratamiento con paclitaxel y DFO. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad utilizando las mismas concentraciones anteriores, pero en presencia de DFO a 300  $\mu$ M. En este caso se observó mayor disminución de la proliferación celular en las dos líneas tumorales en todas las concentraciones. Además, se pudo apreciar que al exponer las células a la concentración mínima de paclitaxel (5 nM) no se observó proliferación celular en las dos

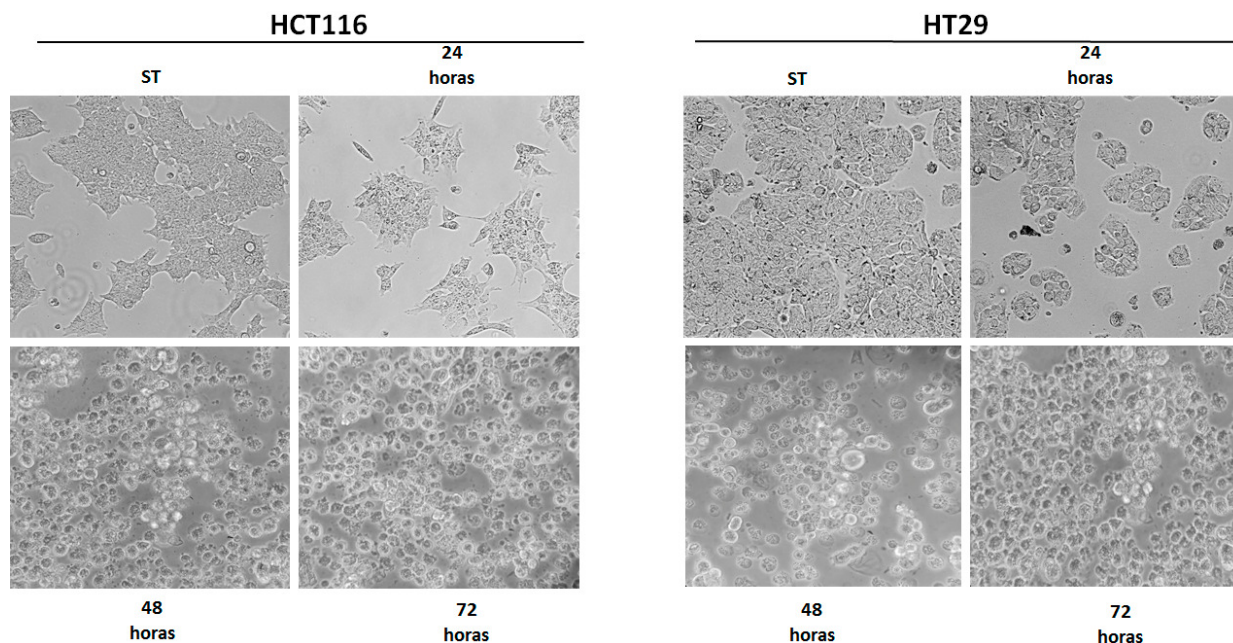
líneas celulares (figura 84), por ello, fue la concentración elegida para llevar a cabo estudios de morfología, ciclo celular, expresión de proteínas e inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales.



**Figura 75. El tratamiento combinado de paclitaxel y DFO disminuye la proliferación celular en líneas tumorales de CCR. A)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento único con paclitaxel durante 72 horas a diferentes concentraciones. **B)** Evaluación de la proliferación celular al realizar el tratamiento combinado con paclitaxel y DFO. Los datos representados corresponden a la media de tres réplicas y de tres experimentos independientes.

Para observar si ocurría un cambio en la morfología celular al tratar las células con paclitaxel y DFO se analizaron imágenes adquiridas mediante un microscopio óptico a los cultivos que fueron expuestos a este tratamiento (DFO 300  $\mu$ M y paclitaxel 5nM) cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

Al comparar las imágenes cada 24 horas se pudo apreciar que la línea HCT116 no presentó cambios hasta pasar las 48 horas de tratamiento, cuando se observó que la mayoría de las células en cultivo se encontraban muertas (figura 76). La línea celular HT29, al igual que la línea anterior, no presentó variación en su morfología pasadas las 24 horas, posteriormente, se observó mayor cantidad de células muertas (figura 76).



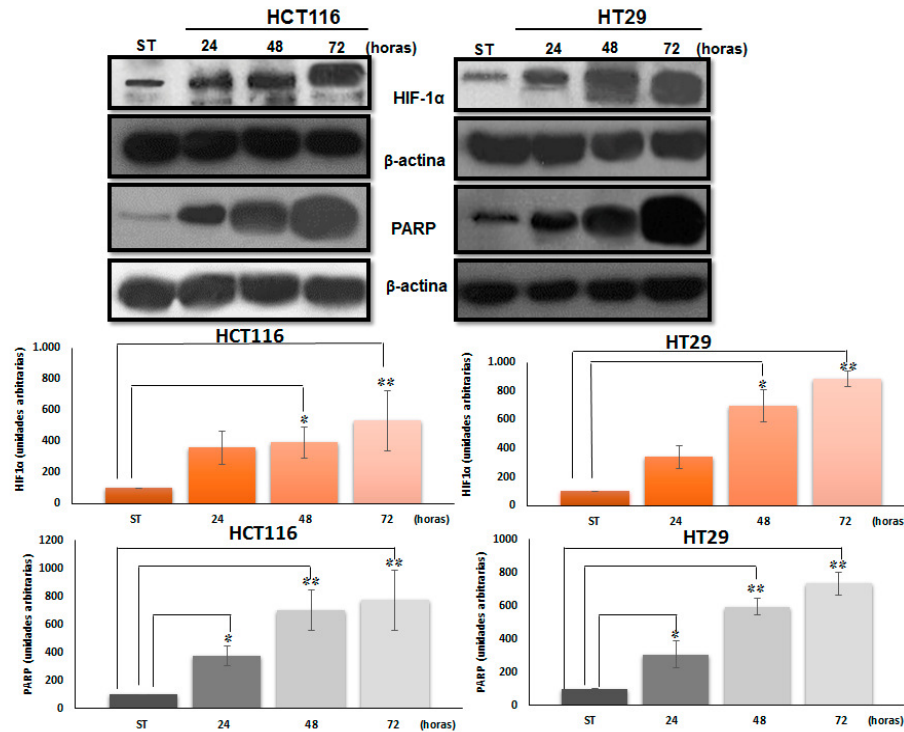
**Figura 76.** Células tumorales derivadas de CCR tratadas con los fármacos paclitaxel y DFO. Las fotografías muestran imágenes obtenidas a través de microscopía óptica cada 24 horas hasta un máximo de 72 horas.

#### 4.5.1 EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA A HIPOXIA EN LÍNEAS TUMORALES DE CCR TRATADAS CON PACLTAXEL Y DFO

Para analizar si el efecto del tratamiento conjunto de paclitaxel y DFO generaba un cambio en la proteína HIF-1 $\alpha$  se evaluó su expresión. Para ello, las células fueron tratadas con el fármaco a 5 nM y en presencia de DFO a 300  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Además, se analizó si ocurría variación en la muerte celular por el tratamiento realizado al estudiar la expresión de la proteína PARP en los mismos rangos de tiempo.

Los resultados obtenidos muestran que en las dos líneas celulares el aumento de la expresión de la proteína fue progresivo y dependiente de las horas en las condiciones descritas (figura 77). La cuantificación proteica de las dos proteínas reflejó que el aumento de la expresión en las dos líneas tumorales fue estadísticamente significativo a partir de las 48 horas de tratamiento (figura 77).

Al evaluar la expresión de la proteína PARP se pudo apreciar el incremento significativo a partir de las 24 horas de tratamiento. Es importante destacar que la expresión continuó incrementando hasta finalizar el ensayo (figura 77).

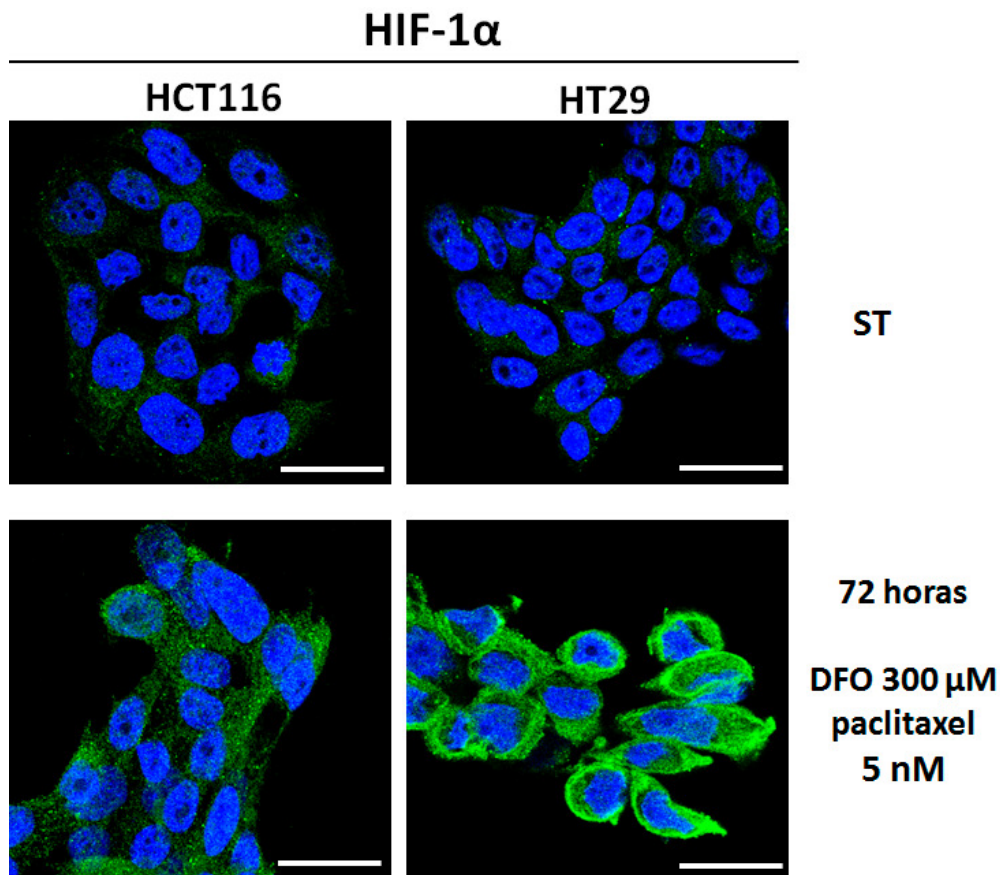


**Figura 77. Expresión de las proteínas HIF-1α y PARP.** Western blot de las proteínas HIF-1α y PARP al transcurrir 24, 48 y 72 horas las líneas tumorales en tratamiento con DFO a 300 μM y paclitaxel a 5 nM. En todos los casos la proteína β-actina fue el control de carga. En las gráficas se observa la cuantificación de la expresión de las dos proteínas a partir del promedio de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Además, a través de ensayos de inmunofluorescencia se observó la expresión y localización de la proteína HIF-1α. Estos ensayos fueron hechos luego de que los cultivos permanecieran 72 horas en presencia de DFO y bajo una concentración de 5 nM de paclitaxel.

En la figura 77 se muestran las imágenes obtenidas a partir de las inmunofluorescencias realizadas posterior al tratamiento con paclitaxel y DFO. En ellas se puede observar que en los cultivos que permanecieron en normoxia (ST) durante 72 horas expresan poco la proteína HIF-1α, la cual se encuentra ubicada exclusivamente en el citoplasma. Sin embargo, en las imágenes obtenidas a partir de los cultivos en tratamiento se puede apreciar que la proteína se acumula de forma uniforme en el citoplasma.

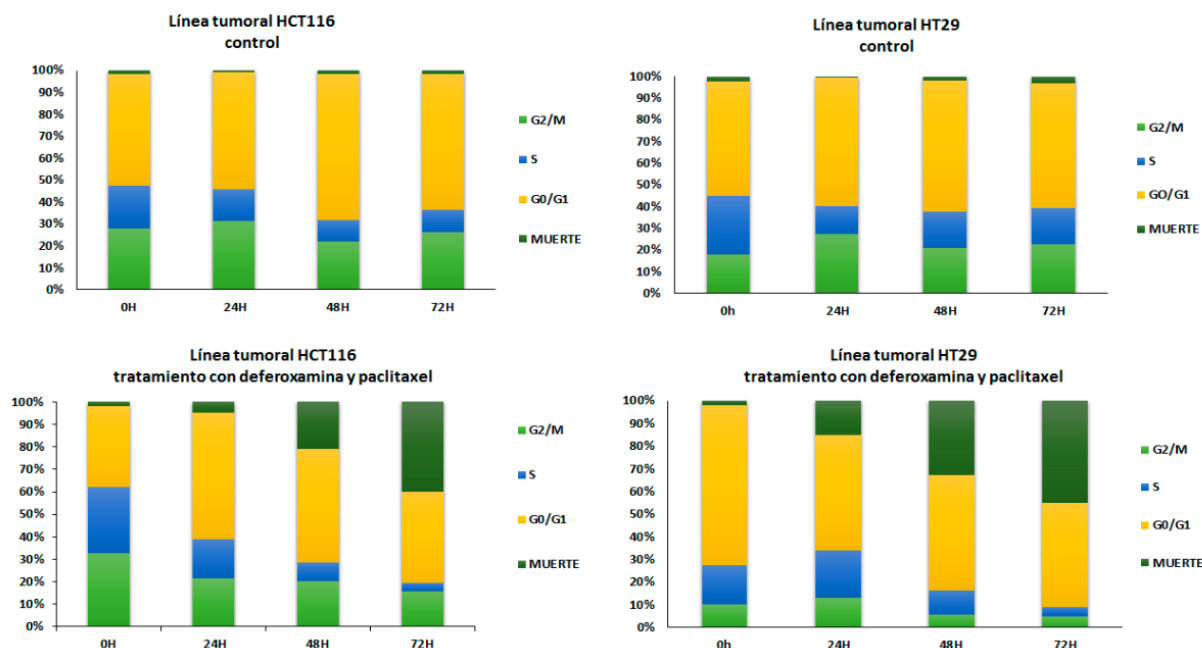




**Figura 78. El tratamiento paclitaxel y DFO incrementa la expresión de HIF-1 $\alpha$  en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al DFO a 300  $\mu$ M y paclitaxel a 5 nM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  se utilizó el anticuerpo primario Anti HIF-1 $\alpha$  Abcam® (ab113642) y el anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore AP307P, el cual permite observar a la proteína de color verde. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).

Debido a la elevada expresión de la proteína PARP y a la cantidad de células muertas observadas en las imágenes de microscopía óptica, se realizó el estudio del ciclo celular con el tratamiento combinado de paclitaxel y DFO a través de citometría de flujo.

En la figura 79 se observan los resultados obtenidos a partir del análisis del ciclo celular, en los cuales se pudo observar que las dos líneas tumorales al ser tratadas con esta combinación de fármacos presentaban un aumento de la mortalidad celular al incrementar las horas de tratamiento. Al transcurrir las 72 horas se observó que la línea HCT116 alcanzaba un 40% de muerte celular ( $p=0.000$ ), mientras que la línea celular HT29 un 45% ( $p=0.000$ ).



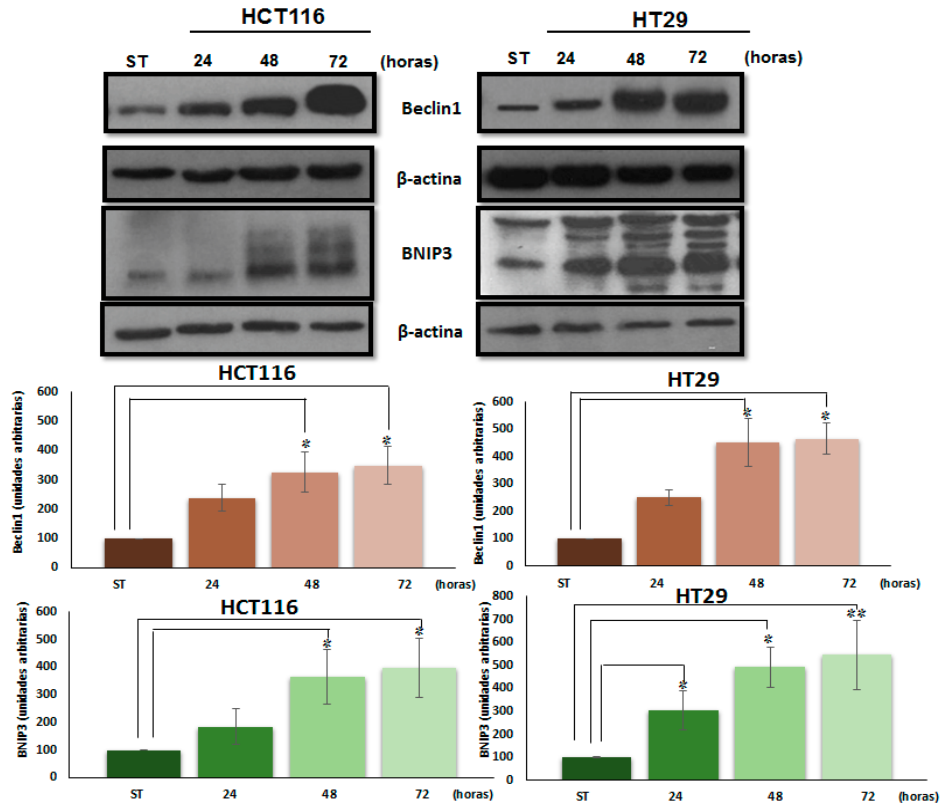
**Figura 79. El tratamiento combinado de paclitaxel y DFO afecta el ciclo celular de las líneas tumorales derivadas de CCR.** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo de las líneas celulares de CCR en tratamiento con paclitaxel a 5 nM y DFO a 300  $\mu$ M. Los datos obtenidos se obtuvieron a partir de tres ensayos diferentes.

#### 4.5.2 EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS TUMORALES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A DFO EN TRATAMIENTO CON PACLITAXEL

Para analizar el efecto de la combinación del tratamiento de paclitaxel y el DFO sobre la autofagia se valió la expresión de las proteínas Beclin1, BNIP3, mTOR, p62, LC3BI/II y ATG5 en las líneas celulares HCT116 y HT29 tratadas con el fármaco paclitaxel a una concentración de 5 nM en combinación con DFO a una concentración de 300  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas.

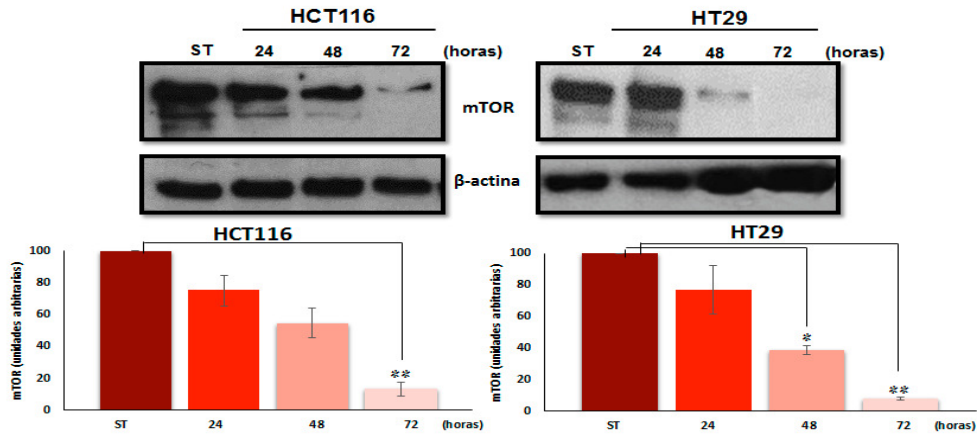
Al evaluar la expresión de Beclin1 se pudo apreciar que en las dos líneas celulares no hubo mayor cambio hasta pasar las 48 horas de tratamiento, cuando se observó el aumento significativo de la expresión hasta pasar las 72 horas (figura 80).

En el caso de la proteína BNIP3, las dos líneas tumorales presentaban un aumento progresivo de la expresión de la proteína. Es importante destacar que este incremento fue mayor en la línea HT29 (figura 80). La cuantificación de la expresión reflejó que el incremento de la proteína fue estadísticamente significativo a partir de las 24 horas en la línea HT29, mientras que en la línea HCT116 fue a las 48 horas.



**Figura 80. Expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y paclitaxel.** Western blot mostrando la expresión de las proteínas Beclin1 y BNIP3 de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y paclitaxel a 5 nM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las dos proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

La expresión de la proteína mTOR en la línea HCT116 disminuyó significativamente al pasar las 72 horas en tratamiento, mientras que en la línea HT29 se observó la inhibición totalmente de su expresión (figura 81). El análisis de la cuantificación indicó que la disminución de la expresión en la línea HT29 fue significativa a partir de las 48 horas (figura 81).

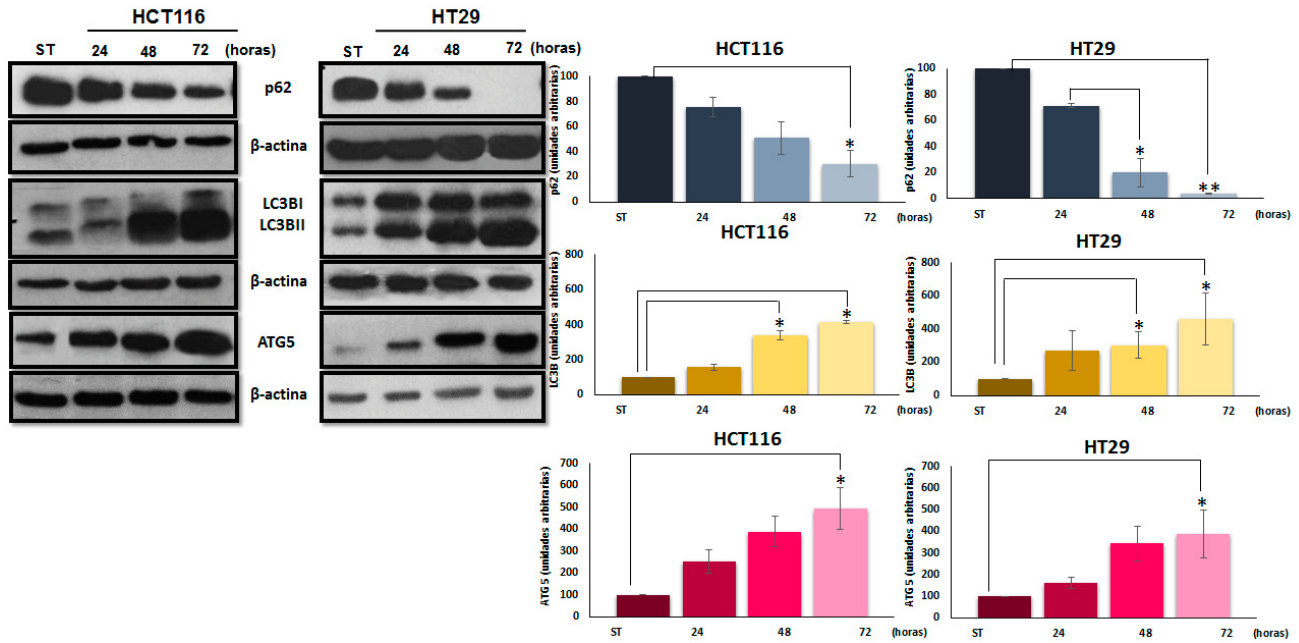


**Figura 81. Expresión de la proteína mTOR en líneas tumorales de CCR expuestas a DFO y paclitaxel.** Western blot mostrando la expresión de la proteína mTOR de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y paclitaxel a 5 nM. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de la proteína anterior. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Los resultados obtenidos en las dos líneas celulares mediante western blot mostraron que la proteína p62 disminuyó progresivamente su expresión hasta las 72 horas en tratamiento. Es importante destacar que, en la línea HT29 se observó la inhibición total de su expresión (figura 82). La cuantificación indicó que en la línea HCT116 la expresión de p62 fue estadísticamente menor al pasar las 72 horas, mientras que en la línea HCT116 ocurrió a partir de las 48 horas (figura 82).

En el caso de la expresión de las isoformas LC3BI/II, los resultados observados reflejaron que el aumento de la expresión ocurría de forma dependiente al tiempo de exposición al tratamiento. No obstante, las dos líneas tumorales presentaron el aumento progresivo de la isoforma LC3BII, mientras que la isoforma LC3BI aumentó levemente su expresión a las 24 horas y posteriormente permaneció estable hasta finalizar el ensayo (figura 82). Al analizar los datos obtenidos de la cuantificación proteica se pudo observar que el aumento en la expresión de LC3B fue estadísticamente significativo a partir de las 48 horas en las dos líneas tumorales (figura 82).

En el caso de la expresión de la proteína ATG5, se pudo apreciar un aumento progresivo de esta proteína en ambas líneas celulares, el cual fue significativo a partir de las 48 horas de tratamiento sin embargo, al pasar las 72 horas este incremento de la expresión fue considerablemente mayor en la línea tumoral HCT116 (figura 82)

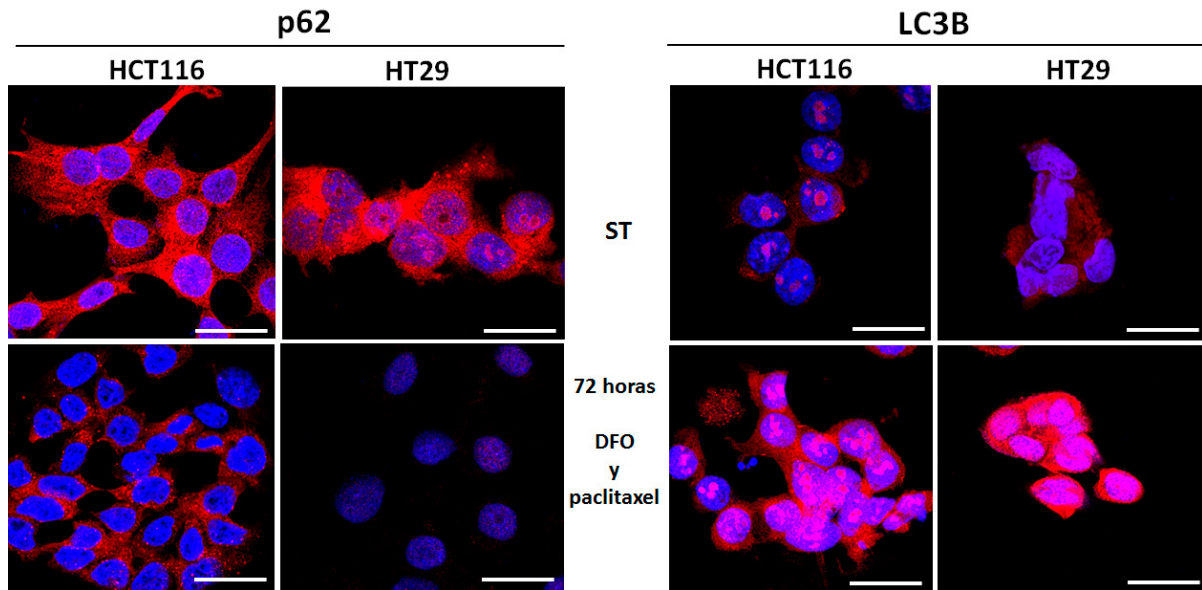


**Figura 82. Expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 de líneas tumorales de CCR en presencia de DFO y paclitaxel.** Western blot que muestra la expresión de las proteínas p62, LC3B y ATG5 a partir de extracciones proteicas provenientes de líneas celulares expuestas durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 300  $\mu$ M de DFO y 5 nM de paclitaxel. En todos los casos la proteína  $\beta$ -actina fue el control de carga. Los gráficos muestran la cuantificación de la expresión de las tres proteínas anteriores. Los valores se obtuvieron a partir del promedio de expresión proteica de 3 ensayos diferentes, \* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$  vs control (ST).

Posteriormente, se realizaron los ensayos de inmunofluorescencia en las dos líneas tumorales con el fin de observar la expresión y localización de las proteínas p62 y LC3B al ser tratadas con paclitaxel y DFO. Estos ensayos se realizaron una vez que las líneas celulares permanecieran 72 horas tratadas con este fármaco en condiciones de hipoxia.

En la figura 83 se pudo apreciar que en las dos líneas tumorales sin tratamiento la expresión de p62 fue mayoritariamente en todo el citoplasma, además se destaca parte de su expresión alrededor del núcleo. En las imágenes de las células tratadas con estos dos fármacos se puede distinguir que la expresión de la proteína fue mucho menor en las dos líneas tumorales al pasar las 72 horas en tratamiento.

En el caso de las proteínas LC3BI/II, no se observó expresión en la mayoría de las células que permanecieron en normoxia (figura 83). Por su parte, las células tratadas, la expresión de LC3BI/II aumentó de forma evidente (figura 83). En estas se observó acumulación principalmente en el citoplasma y el núcleo.



**Figura 83. El tratamiento conjunto de paclitaxel y DFO disminuye la expresión de p62 y aumenta la expresión de LC3B en líneas celulares de CCR.** Células HCT116 y HT29 expuestas durante 72 horas al quelante DFO a 300  $\mu$ M y paclitaxel a 5 nM. Las imágenes de inmunofluorescencia muestran los núcleos celulares teñidos con DAPI y se observan en color azul. Para evaluar la expresión de la proteína p62 y LC3B se utilizaron los anticuerpos primarios Anti-p62 Abcam® (ab109012) y Anti-LC3B Novus Biologicals (NB61384) y como anticuerpo secundario Alexa fluor Millipore A11037, el cual permite observar a la proteína de color rojo. La barra blanca representa 25 micras de largo; (ST: células sin tratamiento).



## **DISCUSIÓN**

## 1. ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN GENES RELACIONADOS CON LA AUTOFAGIA EN PACIENTES CON CCR ESPORÁDICO, SL Y PAF

La autofagia es un proceso altamente regulado necesario para la degradación de proteínas de vida larga y orgánulos. En los últimos años, el estudio de la autofagia ha sido implicado en la patogénesis de múltiples enfermedades, entre las que se incluyen enfermedades cardíacas, infecciosas, inflamatorias, neurodegenerativas, obesidad, diabetes y cáncer (139). El conocimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso autofágico comenzó con el descubrimiento de los genes ATGs en levaduras. Estos genes participan en diferentes etapas de la ruta, forman parte de importantes complejos y son clave en la inducción de la autofagia, en la formación del autofagosoma y en la fusión de éste con el lisosoma (140,141).

En nuestro trabajo hemos estudiado seis polimorfismos (SNPs) en cinco genes que codifican proteínas implicadas en el proceso de autofagia, los cuales son ATG2B rs3759601, ATG5 rs2245214, ATG10 rs1864183, ATG16L1 rs2241880, NOD2 rs2066844 y NOD2 rs2066845, para evaluar el posible papel de estas variantes en la susceptibilidad a padecer CCR esporádico, SL y PAF (Tablas 10, 11 y 12).

El polimorfismo de ATG2B rs3759601 se encuentra ubicado en el exón 25 y consiste en una transversión de citosina por guanina en la posición 4512 del DNA genómico que genera la mutación missense p.Q1383E. En el estudio realizado no hemos encontrado diferencias significativas entre pacientes con SL, PAF y CCR esporádico al ser comparados con la población control. No obstante, se ha descrito este polimorfismo como modulador de la susceptibilidad de otras enfermedades. Análisis realizados en pacientes con cáncer de cabeza y cuello mostró que el genotipo GG se relaciona con un aumento de riesgo a padecer la enfermedad (142). Otras publicaciones han asociado diferentes mutaciones en este gen con la predisposición a padecer cáncer colorrectal (143).

Es importante destacar que en mamíferos existen dos genes ATG2, los cuales presentan funcionalidades redundantes y son fundamentales en la formación del autofagosoma y la regulación de la morfología, el tamaño y la distribución de los agregados lipídicos (144), por lo cual sería importante evaluar otras variantes ubicadas en los dos genes que puedan influir en la predisposición al CCR.

El polimorfismo de ATG5 rs2245214 genera un cambio intrónico y ha sido previamente estudiado en enfermedades como la tuberculosis, el lupus eritematoso, la enfermedad ósea de Paget, el cáncer de tiroides no medular y el melanoma (145–148). En nuestro estudio no hemos encontrado diferencias significativas entre los pacientes con SL, PAF, CCR esporádico y el grupo control. Este resultado ha sido congruente con aquellos encontrados en la tuberculosis y en cáncer de cabeza y cuello (142). No obstante, en el estudio de lupus eritematoso, cáncer de tiroides no medular y melanoma se relaciona el alelo G con un aumento de riesgo a padecer la enfermedad. Debido a que esta mutación intrónica se ha relacionado con diferentes enfermedades, podría estar asociado a otro cambio exónico o con



otro gen localizado en la proximidad no incluido en nuestro estudio. Es importante señalar que, la proteína ATG5 forma parte del complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 y se encuentra involucrada en las primeras etapas de formación del autofagosoma (149).

El polimorfismo del gen ATG16L1 rs2241880 consiste en una transición de adenina por guanina que genera una sustitución missense de treonina por alanina en la posición 300 de la proteína (p.T300A) (150), la cual se encuentra ubicada en un dominio de unión a caspasa (151). Al comparar el polimorfismo rs2241880 entre pacientes con SL, PAF y CCR esporádico con sujetos sanos, no hemos encontrado diferencias significativas. Sin embargo, esta variante ha sido estudiada en otras enfermedades, encontrándose relacionada con la susceptibilidad a desarrollar enfermedad ósea de Paget (147), cáncer gástrico (152), carcinoma de células escamosas de la cavidad oral (142) y enfermedad de Crohn (152,153). En estos estudios la variante incrementa la secreción de TNF- $\alpha$  e IL1 $\beta$  promoviendo mayor inflamación. Diferentes trabajos han descrito que esta variante puede generar disminución de la autofagia ya que es más sensible a la acción de la caspasa 3, inflamación crónica, estado que incrementa la susceptibilidad hacia la enfermedad de Crohn (142). Sin embargo, otros estudios sostienen que los heterocigotos GA y los homocigotos GG tienen menor riesgo a padecer cáncer gástrico y encuentran que ser portador del alelo G (Ala) protege frente a este tipo de cáncer (154). Otros estudios mantienen que los portadores del genotipo GG presentan una mayor supervivencia y menor potencial metastásico de cáncer colorrectal debido al incremento del Interferón tipo I inducible, lo que conlleva a la mejora del pronóstico del CCR (150).

El mecanismo por el cual el polimorfismo estudiado en ATG16L1 puede relacionarse con enfermedades como el cáncer no está claro y existen estudios contradictorios, por lo que son necesarios análisis más exhaustivos y en nuestro caso, ampliar la muestra con un mayor número de pacientes.

Por su parte, el polimorfismo del gen ATG10 rs1864183, consiste en un cambio de una citosina por una timina en la posición 929 del DNA genómico, generando una mutación de cambio de sentido p.T212M (155). El análisis de nuestros resultados sugiere que no existen diferencias significativas entre pacientes que padecen SL, PAF y CCR esporádico con respecto al grupo control. Análisis hechos en pacientes diagnosticados con tuberculosis frente a este polimorfismo no encontraron diferencias significativas. Sin embargo, se ha observado la asociación de esta variante con la producción de IL-8, molécula clave de la respuesta inflamatoria, y que funciona como regulador positivo de la angiogénesis, un proceso fundamental en el desarrollo del cáncer (145). Estudios hechos en la enfermedad ósea de Paget han indicado que el alelo T se relacionaba con una disminución del riesgo a padecer la enfermedad (147). No obstante, otros estudios realizados en pacientes con cáncer de laringe han asociado el alelo T con mayor riesgo de desarrollar este tipo de cáncer (142).

La proteína ATG10 es una enzima E2-like que permite la conjugación de ATG5 con ATG12 para que, posteriormente, éstas puedan formar el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 (156). El polimorfismo estudiado genera un cambio catalítico en la proteína, que puede conllevar a la mala formación de los

autofagosomas. Debido a esto, las células no podrían degradar organelos dañados y podría aumentar el daño en el DNA.

Por último, estudiamos los polimorfismos del gen NOD2 rs2066845 y rs2066844. La primera variante genera el cambio missense citosina por guanina en la posición 2722 en el DNA genómico, generando la mutación p.G908R; y la segunda genera un cambio de una citosina por timina en la posición 2104 en el DNA genómico que produce la mutación p.R702W. El estudio en pacientes con SL, PAF y CCR esporádico no reveló diferencias estadísticamente significativas con el grupo control en ninguna de las variantes estudiadas. Estos polimorfismos también se han evaluado en pacientes diagnosticados con cáncer gástrico sin observar asociaciones entre las variantes y la aparición de la enfermedad (157). Sin embargo, estas variantes se han asociado con la enfermedad de Crohn( 157), colitis ulcerosa (159) y el cáncer colorrectal, aunque en este último caso hay informaciones contradictorias respecto al alelo que aumenta la susceptibilidad (160). En un reciente meta-análisis en el que se incluyen las variantes estudiadas en este trabajo se observa una asociación con el incremento del riesgo de padecer cáncer gastrointestinal. En el caso del polimorfismo rs2066844, los genotipos CT y TT confieren mayor riesgo a padecer CCR, mientras que el polimorfismo rs2066845, los genotipos CC y CG fueron asociados a mayor riesgo de padecer cáncer gástrico (161).

Es importante destacar que la proteína NOD2 (*nucleotide-binding oligomerization domain containing 2*) reconoce patógenos microbianos a través de los dipéptidos de muramilo, que se encuentran en la pared celular. Posteriormente, induce al factor NFkB, que genera el incremento de moléculas proinflamatorias, logrando estimular la inmunidad adaptativa e innata (162). Las variantes de estudio se encuentran ubicadas en repeticiones rica en leucina, por lo que la sustitución de los aminoácidos causada por estas mutaciones podría alterar la función de la proteína, conllevando a que pueda generar inflamación crónica y finalmente llevar al desarrollo del cáncer (163). Además, recientemente, se ha visto que NOD2 es crucial para el reclutamiento de ATG16L1 y la formación del autofagosoma en presencia de una infección bacteriana (164).

En resumen, nuestro estudio pone de manifiesto que los SNPs estudiados no modifican el riesgo de desarrollar cáncer de colon en nuestra población. Es importante destacar que en este trabajo se incluye por primera vez poblaciones con síndromes hereditarios en los que no se han hecho estudios de asociación con estos polimorfismos anteriormente.

## **2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A CONDICIONES HIPÓXICAS EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE TUMORES COLORRECTALES**

La respuesta biológica a las fluctuaciones de oxígeno ha alcanzado un gran interés biomédico ya que es un elemento central en numerosos escenarios patológicos tales como la progresión tumoral. La mayoría de los tumores sólidos desarrollan regiones con baja tensión de oxígeno debido a un desequilibrio en la adquisición y consumo del mismo (164). Tumores sólidos humanos, incluso aquellos

con menos de un centímetro de diámetro pueden tener alguna fracción de sus células hipóxicas, lo que limita la efectividad de su tratamiento, ya que se ha visto que son menos sensibles tanto a la radiación como a la quimioterapia (166). Evidencias tanto clínicas como experimentales indican que la hipoxia en tumores se encuentra asociada a un fenotipo más agresivo e incremento del potencial metastásico e inestabilidad genética (165).

En el presente trabajo hemos evaluado el efecto de la exposición a condiciones de hipoxia tanto de forma física (1% de O<sub>2</sub>) como de forma química (a través del fármaco DFO) en las células derivadas de CCR. Para ello, se evaluó la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en las líneas celulares HCT116 y HT29 al ser expuestas durante un máximo de 72 horas bajo estas dos condiciones.

Los resultados de nuestro estudio mostraron que las dos líneas celulares expuestas a hipoxia física (1% de O<sub>2</sub>) aumentaron la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  progresivamente tras permanecer 72 horas bajo este tipo de estrés. Además, se observó que la proliferación celular no disminuye significativamente en estas líneas tumorales al permanecer expuestas a esta condición durante este período de tiempo. Otros estudios en los cuales se han expuesto diferentes líneas celulares derivadas de CCR a más de dos semanas a 1% de O<sub>2</sub> han indicado que la expresión de HIF-1 $\alpha$  fue significativamente mayor a la observada en los cultivos que permanecieron en normoxia, además la tasa de proliferación fue significativamente mayor comparadas con aquellas que permanecieron en condiciones normales (167,168).

En el caso de la exposición a DFO, molécula que se conoce por ser un quelante de hierro de alta afinidad, que tiene la habilidad de mimetizar la hipoxia a través de la inhibición de las enzimas hidroxilasas (72), se realizaron ensayos a diferentes concentraciones crecientes del fármaco para poder determinar la concentración óptima a la cual ocurriría mayor acumulación de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Los resultados mostraron que para las dos líneas tumorales la concentración en la cual se observaba mayor expresión de la proteína fue a 300  $\mu$ M. Trabajos de otros grupos con esta molécula muestran que la estabilización de esta proteína ocurre a menores concentraciones, como es el caso de las líneas celulares de cáncer gástrico (168), células de neuroblastoma (169) y carcinoma de ovario (138). Estas diferencias pueden deberse a que en la mayoría de las células tumorales el metabolismo del hierro se encuentra alterado (170). Algunos estudios han propuesto que la progresión del CCR está relacionado con la sobre expresión de proteínas que importan hierro y con la disminución de aquellas que lo exportan (170), lo que podría explicar porque estas células requieren mayor concentración del quelante para generar la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ .

Al tratar las dos líneas celulares con DFO a 300  $\mu$ M durante 72 horas se observó el incremento significativo de la proteína HIF-1 $\alpha$  a partir de las 24 horas en tratamiento. Además, se evaluó el efecto en la proliferación celular al tratar las células tumorales durante 72 horas a diferentes concentraciones de DFO. En este caso, se apreció que a partir de 300  $\mu$ M la proliferación celular en las dos líneas tumorales fue significativamente menor. Resultados similares se han observado en otras células tumorales, en las cuales se ha visto que el uso de quelantes de hierro puede disminuir la proliferación tumoral tanto *in vitro* como *in vivo* (168). Estudios en células de cáncer gástrico mostraron la inhibición

de la viabilidad celular de forma dosis dependiente hasta un máximo de 100  $\mu\text{M}$ , lo que puede sugerir que la dosis para la inhibición de la proliferación puede cambiar dependiendo del tipo tumoral (171). Recientemente se ha visto que los quelantes de hierro inducen la activación de las caspasas en linfomas y células mieloides, sin embargo, el mecanismo por el cual podría afectar a los tumores sólidos aún no ha sido establecido (170).

Además de la evaluación de la proteína HIF-1 $\alpha$ , se analizó la expresión de la proteína PARP, apreciando que en las dos líneas celulares la expresión de esta proteína fue significativa a partir de las 48 horas de tratamiento al ser expuestas tanto a hipoxia física (1%  $\text{O}_2$ ) como hipoxia química (DFO).

La proteína PARP es un sensor molecular de daños en el DNA, de modo que su actividad catalítica se estimula por unión a roturas en la molécula del DNA y desempeña un papel clave en la organización espacial y temporal de la reparación, la cual ocurre a través de la asociación física con proteínas nucleares para lograr el mantenimiento de la integridad genómica (172). PARP está involucrada en el proceso de muerte celular, tanto en la apoptosis como en necrosis. En el proceso de apoptosis, PARP es uno de los sustratos específicos de la caspasas 3 y 7, lo cual genera la separación de su dominio catalítico, por lo que conserva su actividad basal pero no la actividad inducida por el daño al DNA (173,174). Esta actividad de las caspasas frente a la proteína PARP es considerada como un marcador de apoptosis. Además, promueve un tipo de muerte celular apoptótica independiente de caspasas a través de la proteína AIF (*apoptosis-inducing factor*), que es una oxidorreductasa mitocondrial que se libera al citoplasma para inducir muerte celular en respuesta a la activación excesiva de PARP (175).

Estudios realizados en células de cáncer gástrico mostraron un aumento de la actividad de las caspasas y la isoforma de PARP basal con respecto al tiempo en el cual las células permanecían en DFO (168). Otros trabajos han reportado que el DFO puede incrementar los niveles de ROS en las células tumorales, lo que se ha relacionado con el estrés del retículo endoplasmático y puede conllevar a la generación de proteínas mal plegadas. Estas proteínas tienden a formar agregados que generan la activación de la respuesta UPR, si este tipo de estímulo se mantiene y no es compensado puede activar la apoptosis en células cancerígenas (169,176).

Al analizar los cambios morfológicos en las líneas tumorales al estar expuestas bajo una concentración del 1%, apreciamos que las dos líneas celulares presentaron mayor extensión del citoplasma, incremento del número de vesículas y prolongaciones parecidas a los fibroblastos. Estas mismas características se observaron al exponer las dos líneas tumorales al tratamiento con DFO durante el mismo período de tiempo. En otros estudios en los cuales se han expuesto diferentes tipos celulares a hipoxia (1%  $\text{O}_2$ ) *in vitro* se han observado cambios similares con pérdida de polaridad, rasgos que son relacionados con la Transición Epitelio Mesénquima (*Epithelial-Mesenchymal Transition* o EMT) (177), proceso biológico por el que las células epiteliales polarizadas, que normalmente interactúan con la membrana basal a través de su superficie basal adquieren fenotipo de células mesenquimales, aumentando su capacidad migratoria e invasiva (178). Otros trabajos han indicado que la línea HT29 al estar expuesta al DFO presentaron las mismas alteraciones morfológicas,

como ampliación de su citoplasma y una estructura aplanada; además, se observaron más aisladas con forma de fibroblasto, en comparación con aquellas que no fueron tratadas, que presentaban una morfología más redondeada y con múltiples conexiones (179). Este mecanismo ha sido relacionado con la estabilización y sobreexpresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  tanto en células de cáncer de próstata como en células de CCR. Se ha observado que en estos tipos de cáncer los genes involucrados en este proceso, como la E-cadherina y la vimentina, se encuentran alterados en parte de las células de los tumores donde existe sobreexpresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , y la pérdida del fenotipo epitelial (180).

Al analizar los resultados del ensayo de *scrath* en las dos líneas tumorales tanto en condiciones normales como en presencia de DFO hemos observado que las células expuestas a este quelante tienen una migración significativamente mayor que las células que permanecieron en condiciones normales. Diferentes trabajos han realizados ensayos en las líneas HCT116 y HT29 en los que sobreexpresan el gen *HIF-1 $\alpha$*  demostrando que al incrementar la proteína HIF-1 $\alpha$ , la capacidad migratoria e invasiva aumenta con respecto a aquellas células en las cuales este gen no sobreexpresa (180). Otros trabajos en los cuales se ha utilizado el DFO como modelo de mimetización de hipoxia han observado resultados similares a los obtenidos en nuestro estudio, sugiriendo que este quelante podría promover la migración e invasión en células de cáncer de mama (181). Otros estudios que han tratado células de CCR en condiciones de hipoxia (1% de oxígeno) han mostrado que estas células presentan potencial para desarrollar el proceso de EMT, y por consecuencia, adquirir rasgos invasivos y metastásicos (182).

La comparación del efecto en la migración entre las dos líneas tumorales expuestas al DFO mostró que a partir de las 16 horas la línea celular HCT116 presentaba un aumento del porcentaje de migración estadísticamente significativo con respecto a la línea celular HT29. Esto puede deberse a que en las células tumorales se ha observado que existen alteraciones en los genes involucrados en el proceso de EMT (178), lo que puede facilitar que algunas células puedan activar más rápido este mecanismo. Múltiples trabajos han indicado que la pérdida de la regulación en el gen de la proteína E-cadherina puede ser considerado como el primero y el más importante paso para el desarrollo del proceso EMT. Este gen puede ser silenciado por diferentes mecanismos que incluyen la metilación aberrante y la supresión transcripcional (183).

En conclusión, nuestros datos muestran que las células tumorales derivadas de CCR expuestas tanto a hipoxia física como química generan el aumento de expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Esta sobreexpresión permite la activación de más 100 genes necesarios para la inducción de vías de señalización cruciales para la supervivencia celular (184). Sin embargo, la exposición al quelante genera la disminución significativa de la proliferación celular, lo que no ocurre en las células expuestas a 1% de O<sub>2</sub>. Esto podría deberse a que la exposición prolongada a este quelante afecta vías metabólicas como la generación de ATP, el transporte de oxígeno y la síntesis de DNA (185), ya que el hierro es una de las moléculas necesarias para el funcionamiento de estas vías de señalización, conllevando a la disminución de la viabilidad celular.

La exposición prolongada a estos dos tipos de modelos de hipoxia puede conllevar a la activación de la apoptosis como respuesta a situación de estrés. La falta de oxígeno puede inducir apoptosis al causar la permeabilidad del interior de la membrana mitocondrial y conllevar a la liberación del citocromo C al citosol y genera la activación de las caspasas, así como la inhibición de la cadena transportadora de electrones (186). En el caso del DFO puede incrementar la producción de radicales hidroxilos, elevar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que se encuentra asociado a la activación de la apoptosis (181).

Los cambios morfológicos son fundamentales en muchos procesos celulares, entre los que se incluye la migración y la diferenciación (179). Algunos trabajos señalan que bajo condiciones hipóxicas, las células cancerígenas desarrollan mecanismos de escape para sobrevivir y evitar el microambiente no favorable, lo que incrementa el potencial migratorio e invasivo (187). En nuestro estudio hemos mostrado que a medida que trascurría el tiempo de exposición de las células tumorales a estos dos modelos de hipoxia ocurrían cambios en la morfología celular los cuales se pueden asociar al aumento de la expresión de HIF1- $\alpha$  y a su vez a la capacidad de las células a migrar hacia otros tejidos.

Estos resultados sugieren que HIF1- $\alpha$  es una de las proteínas más importantes en la promoción del proceso de EMT y en consecuencia de la metástasis. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los cuales ocurre este proceso no se encuentran clarificados (180). Además, que se ha visto que la co-expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y vimentina y la disminución de la expresión de la proteína E-cadherina podrían ser marcadores potenciales para predecir potenciales metastásico en pacientes con CCR. Además, el uso de quelantes de hierro como terapia antitumoral podría generar efectos secundarios como la promoción de metástasis por el incremento de la expresión del factor HIF-1 $\alpha$  (181).

### **3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA AUTOFAGIA EN LÍNEAS TUMORALES DERIVADAS DE CCR EXPUESTAS A HIPOXIA**

**AN**

La autofagia se ha considerado como un mecanismo protector al prevenir la muerte celular en microambientes hostiles o situaciones de estrés, dentro de los cuales se incluye la hipoxia (188). Se ha reportado que la hipoxia es una de las condiciones que se pueden observar en diferentes patologías como es el caso de los tumores sólidos (128).

En este trabajo hemos analizado la variación del proceso autofágico en líneas celulares derivadas de tumores de CCR expuestas a una 1% de O<sub>2</sub> y al DFO durante diferentes períodos de tiempo (1, 4, 8, 24, 48 y 72 horas) con la finalidad de estudiar si este proceso podría ser inducido de la misma manera con estas dos modelos experimentales.

En primer lugar, hemos analizado la expresión de las proteínas BNIP3 y Beclin1, observando que en las dos líneas tumorales la expresión de estas dos proteínas incrementaba significativamente al

pasar el tiempo expuestas a estos dos tipos de condiciones (1% O<sub>2</sub> y DFO). Diferentes estudios han mostrado que otras líneas celulares derivadas de diversos tipos de cáncer (mama, próstata y colon) expuestas a concentración de oxígeno baja (1% de O<sub>2</sub>) elevan la expresión de la proteína BNIP3 (189), lo que se ha visto relacionado con la acumulación de la proteína HIF-1 $\alpha$  (81,137,189,190). De la misma forma, en trabajos realizados tanto en células de cáncer de hígado como en células neuronales han observado que el tratamiento con DFO incrementa significativamente los niveles proteicos de BNIP3 y Beclin1 (191).

Nuestros resultados sugieren que la poca disponibilidad de oxígeno (1%) en las células derivadas de CCR podrían generar un incremento de ROS por el complejo III de la cadena respiratoria, lo que inhiben la actividad de las PHDs (192), al igual que la exposición a quelantes de hierro como el DFO, lo que conlleva a la estabilización de la proteína HIF-1 $\alpha$ . La elevación de su expresión generaría la inducción de la transcripción de genes dentro de los cuales se encuentra BNIP3 (192).

La proteína BNIP3 como Beclin1 son parte de la familia de proteínas de dominio BH3, lo que les permite la interacción con las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL. Se ha demostrado que Beclin1 presenta menor interacción con las proteínas Bcl-2 y Bcl-xL. Al generarse la situación de hipoxia esta interacción entre Beclin1 y Bcl-2 puede inhibirse por la sobreexpresión de la proteína BNIP3, ya que se ha observado que el dominio BH3 de estas proteínas presenta mayor interacción con Bcl-2 (193), conllevando a que la proteína Beclin1 pueda inducir el proceso de autofagia estas condiciones.

Además, en nuestro estudio observamos que la expresión de la proteína ATG5 mostraba un aumento significativo al igual que el de las proteínas BNIP3 y Beclin1 al incrementar el tiempo de exposición en los dos modelos experimentales (1% de O<sub>2</sub> y el DFO). Diferentes estudios han señalado que células tumorales de cáncer de mama, colon y ovario bajo condiciones hipóxicas (1-0,01%) incrementan la expresión de las tres proteínas en función del tiempo de exposición, además, al realizar el silenciamiento de BNIP3, Beclin1 o ATG5 bajo estas condiciones generaba el aumento en la muerte celular (81,188).

Se ha descrito que ATG5 es una de las proteínas que interviene el proceso de elongación de la membrana de los autofagosomas formando conjugados que se disocian después de la de la formación de la vacuola autofagosomal (89). Esto podría indicar en las células derivadas de CCR expuestas a estos modelos experimentales genera la formación de los autofagosomas.

Al evaluar la expresión de la proteína p62 y mTOR observamos su disminución significativa de forma dependiente al tiempo que permanecían los cultivos tanto en hipoxia como con DFO, sin embargo, la expresión de la proteína LC3B mostró un aumento significativo tras las 72 horas de exposición a estos dos modelos experimentales. Estos resultados fueron corroborados al realizar ensayos por inmunofluorescencia de las proteínas p62 y LC3B, en los cuales se observó el aumento de LC3B tanto en el citoplasma como en el núcleo y la inhibición de p62. Resultados similares se han observado en células de glioblastoma expuestas a DFO y concentración de oxígeno baja, en las cuales se relaciona el proceso de autofagia con la degradación de p62 y el incremento de la isoforma LC3BII junto con el aumento de la expresión de la proteína BNIP3 (185,194). Tanto la proteína p62 como

LC3BII son catalogadas como marcadores del proceso autofágico, p62 se encuentra involucrado en la autofagia selectiva y LC3B en la formación de los autofagosomas (195), por lo cual nuestros resultados pueden corroborar tanto la formación de los autofagosomas como culminación del proceso, ya que se ha demostrado que p62 permite la eliminación específica de proteínas, orgánulos dañados entre otros (107) al ser ubiquitinizados y anclarse a la membrana del autofagosoma (109). Este anclaje produce la interacción entre la proteína p62 y la proteína LC3B lo que podría sugerir que el proceso de autofagia se activa en los dos modelos experimentales conllevando a la activación de diferentes vías de señalización que permiten la supervivencia celular.

Por su parte, la proteína mTOR que es un importante regulador del crecimiento celular y por tanto en el desarrollo tumoral (196) en nuestro estudio se inhibe al ser expuesto a condiciones hipóxicas. Esto podría deberse a que la estabilización de HIF-1 eleva la expresión de la proteína REDD1 (*Regulation of DNA damage response 1*), la cual inhibe también mTORC1 (197). Otros estudios han demostrado que el complejo mTORC1 puede ser inhibido por la fosforilación de TSC2 por la proteína AMPK (*monophosphate-activated protein kinase*) en condiciones hipóxicas (197). Por esto, se podría asociar la disminución de la proteína mTOR con la inhibición del complejo mTORC1, lo que podría sugerir que la activación de la autofagia también puede tener lugar por vía independiente de HIF-1 en líneas tumorales de CCR en condiciones de hipoxia(198).

Diferentes trabajos señalan que la activación de la autofagia en condiciones de hipoxia puede ocurrir por 3 vías de señalización diferentes: la vía de señalización dependiente de HIF, la vía de mTOR y la vía UPR. Se ha visto que el estrés en el retículo endoplasmático y la hipoxia pueden estar relacionados con la vía de señalización de mTOR a través de cambios en los niveles de calcio citoplasmático. La hipoxia puede incrementar el flujo proteico hacia el retículo endoplasmático, causando estrés y generar la activación de la vía de AMPK a través de CAMKK2 (*calcium-calmodulin-dependent kinase 2*), lo que conlleva la inactivación de mTOR y la activación de la autofagia. Otros artículos han observado que la proteína BNIP3 también se localiza en el retículo endoplasmático, lo que podría generar la activación de la autofagia en este organelo (195).

Nuestros resultados pueden sugerir que el modelo experimental de mimetización de hipoxia puede generar la activación de la autofagia en líneas celulares derivadas de CCR de la misma manera que las condiciones de baja concentración de oxígeno. En nuestro caso este proceso autofágico se activaría tanto de forma dependiente del factor de transcripción de HIF al activar la inducción de BNIP3, para disminuir la acumulación de ROS y evitar el proceso de apoptosis, así como de forma independiente de HIF, al inhibir la proteína mTOR, conllevando a la supervivencia y proliferación celular.

La mimetización de la hipoxia a través del DFO podría ser utilizado para futuras investigaciones en diferentes tipos de tumores para poder esclarecer a fondo como este proceso funciona y permite la supervivencia tumoral y poder definir a futuro una diana terapéutica que evite la activación de este proceso en tumores sólidos que tiene como una de las características principales la formación de focos de hipoxia.



#### 4. MODIFICACIONES DE LA AUTOFAGIA EN RESPUESTA A FÁRMACOS EN CONDICIONES DE HIPOXIA

Diferentes grupos de investigación han reportado estudios preliminares en los cuales el quelante DFO en combinación con múltiples fármacos quimioterápicos ha sido beneficioso como terapia antiproliferativa (185), por lo cual hemos evaluado la modificación de la autofagia al tratar las células tumorales derivadas de CCR con 5 fármacos diferentes en presencia de DFO.

##### **Análisis del efecto de la metformina en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO.**

La metformina es una molécula de la familia de las biguanidas (comercializada como hipoclorito de 1,1-dimetilbiguanida), comúnmente usada como tratamiento oral para la diabetes tipo 2 (199, 200). En los últimos años se ha visto que la metformina podría tener un efecto antitumoral, al encontrar que los pacientes con diabetes de tipo II tratados con metformina mostraban un menor riesgo a padecer cáncer (201). Posteriormente, otros grupos han obtenido resultados similares (202). En 2013, se publicó un meta-análisis que incluyó 24.410 pacientes y se encontró que el uso de la metformina estaba asociado a un menor riesgo de muerte por cáncer (203). Este fármaco ha demostrado ser efectivo inhibiendo el crecimiento tumoral en leucemia, cáncer de páncreas, próstata, ovario, melanoma, mama, endometrio, pulmón, carcinoma hepatocelular y gliomas (204).

Hasta la fecha, se conocen dos mecanismos de acción de la metformina, el primero de ellos es la inhibición del complejo I de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (ETC1), provocando una disminución en la cantidad de ATP, que incrementa AMPK, es un regulador del homeostasis, el metabolismo y la síntesis de proteínas al inhibir mTOR. Por otra parte, la metformina modifica el metabolismo global, limitando los niveles de insulina y la producción de IGF-1 por parte del hígado, al disminuir su gluconeogénesis; de esta manera, se disminuye la activación del receptor de insulina/IGF-1, que conlleva la no activación de la ruta de PI3K y a la inhibición de mTOR (205). Al inhibir mTOR a través de sus dos mecanismos de acción, la metformina es un inductor de la autofagia (206).

El estudio del efecto de metformina en líneas celulares de CCR mostró que, al utilizar únicamente este fármaco como tratamiento antitumoral, disminuye levemente su proliferación de manera dosis dependiente. Diferentes trabajos han comunicado resultados similares a los obtenidos en este estudio, en los cuales otros tumores derivados de cáncer de mama, próstata, páncrea, ovario y pulmón este fármaco ejerce un efecto antiproliferativo (207–210).

Al combinar el tratamiento metformina con DFO se observó que la viabilidad celular disminuye significativamente, hasta observarse que en las dos líneas tumorales al utilizar la concentración de 8 mM no se observó proliferación celular. Además, las dos líneas tumorales a las 72 horas de tratamiento presentan menor número de células que al inicio del ensayo, prolongaciones del citoplasma y mayor cantidad de vesículas en el mismo. Por lo que podemos sugerir que la combinación de estos dos fármacos genera mayor sensibilidad en comparación al tratamiento único con metformina. Esta combinación permitiría reducir la dosis de metformina, ya que nuestros resultados muestran que se requeriría de concentraciones más altas para observar el mismo efecto. Se ha demostrado que la

metformina se acumula más en los tejidos que en la sangre (211), lo que sugiere que las dosis farmacológicas pueden ser menores en los tejidos y generar el mismo efecto, por lo cual sería necesario realizar el mismo tratamiento en modelos animales para evaluar con mayor exactitud que concentración es la idónea para generar el efecto antitumoral.

El estudio de expresión de HIF-1 $\alpha$  y PARP mostró el aumento progresivo de estas proteínas tras 72 horas de tratamiento en las dos líneas celulares y las imágenes de inmunofluorescencia corroboran la estabilización de HIF-1 $\alpha$ . Estos resultados son congruentes con otros estudios realizados en células de CCR en las cuales se observa que el tratamiento con metformina y DFO no reduce la expresión de HIF-1 $\alpha$  (212). Sin embargo, estudios realizados en carcinoma oral de células escamosas sugieren que la combinación de metformina y otros mimetizadores de hipoxia como el cloruro de cobalto disminuyen la expresión de HIF-1 $\alpha$  y pueden generar el aumento en la expresión de las PHDs (213). Otros estudios realizados en células de cáncer de hígado indican que al exponer estas células a hipoxia (1% O<sub>2</sub>) en presencia de metformina se inhibe la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , esto se debe que al inhibir el complejo 1 de la cadena respiratoria, limita el flujo de electrones hacia el complejo 3 reduciendo la formación de ROS y como consecuencia no generaría la activación de HIF-1 $\alpha$  a través de ROS (214). Tomando en cuenta todos nuestros resultados podemos sugerir que la combinación de estos dos fármacos no genera la inhibición de HIF-1 $\alpha$ , lo que indicaría que este quelante de hierro permite la estabilidad de HIF-1 $\alpha$  de forma independiente de la cadena respiratoria.

Estudios recientes han observado que la metformina puede estar relacionada con la activación del proceso de apoptosis a través de la activación de la vía de señalización de las caspasas en células tumorales de páncreas (209). Otros estudios han indicado que la combinación del tratamiento con metformina y cloruro de cobalto, genera la activación de la caspasa 3, una de las proteínas que actúa junto con PARP en el proceso de activación de la apoptosis (213). En nuestro trabajo hemos observado el incremento significativo de PARP basal a partir de las 48 horas de tratamiento, lo que indicaría la acción de las caspasas al interaccionar con PARP y como consecuencia la activación del proceso de apoptosis.

Al evaluar el efecto del proceso autofágico hemos observado una disminución significativa de p62 en las dos líneas celulares incluidas en nuestro estudio, confirmando el efecto inductor de este proceso. En el caso de LC3BI/II, sus niveles de expresión incrementaron de manera significativa, así como los de Beclin1 y ATG5. Todos estos datos pueden sugerir que el tratamiento con metformina en hipoxia aumenta y mantiene la autofagia en las líneas celulares derivadas de CCR.

Por su parte mTOR disminuye su expresión de forma significativa tras 72 horas de tratamiento. Esto es similar a lo publicado por otros grupos que observan que la metformina es una molécula con carga positiva que se acumula en la matriz mitocondrial e inhibe el transporte de electrones en este orgánulo, provoca una reducción en la oxidación de NAD (*nicotinamide adenine dinucleotide*) y en la síntesis de ATP (312). La disminución en la síntesis de ATP activa a AMPK, que es un sensor celular de energía. La activación de AMPK suprime a mTOR, lo que provoca una disminución en la síntesis proteica y la proliferación celular (313).

Otros grupos ya han señalado que tanto el tratamiento con DFO como con metformina genera un efecto antiproliferativo en diversas líneas tumorales (215, 216). En nuestro trabajo hemos observado que las líneas de CCR presentan mayor sensibilidad al combinar estos dos fármacos, esto podría deberse a que presentan tanto activación del proceso de autofagia como la activación del proceso de apoptosis. Es importante destacar que diversos trabajos señalan que la sobreactivación del proceso autofágico puede conllevar a la muerte celular (228).

### **Análisis del efecto de la Decitabina en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO**

La 5-aza-2'-deoxicitidina o Decitabina® es un análogo de citidina que se incorpora al DNA e inhibe la metilación mediada por las DNA metiltransferasas (DNMTs). Esto ocurre debido a que el átomo de carbono aceptor del grupo metilo de la citidina se sustituye por nitrógeno, impidiendo la metilación (218). Se ha observado que la metilación del DNA es un evento importante en la carcinogénesis y, por ello, los inhibidores de DNMTs se han convertido en una herramienta terapéutica contra el cáncer (219).

En nuestro trabajo hemos evaluado el efecto sobre la proliferación celular al tratar a las líneas celulares solo con Decitabina® y con la combinación de este fármaco con el DFO. Los resultados del tratamiento con Decitabina® solo generaron una leve disminución de la proliferación, la cual fue dependiente de la concentración del fármaco. Sin embargo, al realizar el tratamiento combinado se pudo observar que el efecto en la proliferación celular fue mayor y a partir de 6  $\mu\text{M}$  se observó la inhibición total de su crecimiento tras 72 horas de tratamiento. Resultados similares se han observado en estudios recientes en los cuales se observó la combinación del tratamiento de quelantes de hierro, como es el deferasirox (DFX) y la Decitabina® en líneas celulares de leucemia y han mostrado que genera una interacción aditiva con respecto a la proliferación celular, conllevando a la inhibición de la viabilidad (231). Nuestros resultados sugieren que la sinergia del DFO con la Decitabina® puede generar un mayor efecto antiproliferativo en células derivadas de CCR, lo que indicaría que la combinación podría disminuir la dosis de Decitabina® y evitar menores efectos secundarios si se aplicara a futuro en ensayos clínicos. Además de ser un inicio para futuras investigaciones en las cuales se pueda entender molecularmente como esta sinergia entre quelantes de hierro y fármacos epigenéticos puede favorecer un efecto antiproliferativo en el CCR.

Se ha visto que la Decitabina® es útil en el tratamiento de diferentes tipos tumorales y su uso ha sido aprobado para el tratamiento del síndrome mielodisplásico y la leucemia mieloide aguda. La dosis administrada en estos pacientes puede variar de 3 a 11  $\mu\text{M}$  (221) y su acción mejora en sinergia con otros agentes quimioterápicos o radioterápicos en diferentes tipos tumorales (222).

Para analizar si esta sinergia tenía un efecto en la ruta autofágica y en la apoptosis observamos la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y PARP. En nuestro estudio observamos que la expresión de estas dos proteínas aumentaba significativamente a partir de las 48 horas de tratamiento, lo que podría indicar la activación de la apoptosis y que el tratamiento no afecta la estabilización de HIF-1 $\alpha$ , y como consecuencia no afectaría la activación de la autofagia dependiente de HIF-1.

Al observar la expresión de las proteínas autofágicas en las dos líneas celulares tratadas con estos dos fármacos se pudo apreciar el aumento de la proteína LC3BII, Beclin1, BNIP3 y ATG5, así como la disminución de la expresión de p62 y mTOR, por lo que podemos sugerir que esta sinergia induce y mantiene la autofagia tras 72 horas de tratamiento. Este mismo resultado fue observado al utilizar el DFO como tratamiento único, lo que podría sugerir que la autofagia no se ve afectada por la adición de la Decitabina®. Por esto, sería necesario analizar la expresión de las proteínas autofágicas únicamente en presencia de Decitabina® para realmente esclarecer si este fármaco genera un efecto en el proceso autofágico.

Diferentes estudios han demostrado que los inhibidores de metil transferasas causan muerte celular induciendo la apoptosis (223). Se ha reportado que la Decitabina® puede inducir apoptosis en líneas celulares de leucemia (224,225) y en un estudio reciente con el quelante de hierro DFX y Decitabina® han indicado que este tratamiento puede incrementar la apoptosis celular (223). Sin embargo, se requieren de más estudios que permitan corroborar esta activación.

Diversos trabajos han mostrado que el tratamiento con Decitabina® en condiciones de hipoxia puede evitar la metilación del gen *BNIP3* en líneas celulares de cáncer de páncreas (226, 227). Como se ha comentado anteriormente, BNIP3 se encuentra asociado a la inducción de la autofagia en condiciones de hipoxia, pero también se encuentra relacionado con la activación de la apoptosis. Sin embargo, en nuestro trabajo al evaluar la expresión de BNIP3 tanto en la presencia exclusiva de DFO como con el tratamiento combinado con Decitabina® no observamos diferencias, por lo cual, la acción de la Decitabina® variaría la expresión de otros genes que podrían conllevar a la activación de la apoptosis, pero se requiere de diversos estudios para corroborar este efecto.

En conclusión, se presenta por primera vez en células derivadas de CCR el estudio de la combinación de la Decitabina®, un inhibidor de DNA metiltransferasas, con el DFO, quelante de hierro e inductor autofágico, el cual mejora los resultados de viabilidad comparado con los obtenidos usando la Decitabina® en monoterapia.

### **Análisis del efecto de la cloroquina en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO**

La cloroquina (CQ) (N'-(7-chloroquinolin-4-yl)-N,N-diethyl-pentane-1,4-diamine) es un agente lisosomotrópico capaz de atravesar la membrana lisosomal para protonarse, incrementando el pH del orgánulo. Fue inicialmente desarrollada como tratamiento antimalárico, aunque actualmente se usa también para el tratamiento de enfermedades reumatológicas, inmunológicas y dermatológicas (228).

Este fármaco inhibe la fosfolipasa A2 y la acilhidrolasa lisofosfolipídica, necesarias para la acidificación del lisosoma, favoreciendo, así, el incremento del pH del orgánulo, impidiendo la degradación de las sustancias que hay en él e inhibiendo la autofagia (228). Recientemente, se ha analizado su capacidad antitumoral en combinación con radioterapia o agentes quimioterápicos, obteniendo resultados prometedores en cáncer de mama (229), melanoma, cáncer de colon (230), gliomas (231), entre otros.

Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con cloroquina en líneas derivadas de CCR disminuye la proliferación de forma dependiente al aumento de la concentración de este fármaco hasta ser inhibida en las dos líneas tumorales a 75  $\mu\text{M}$ . Otros estudios realizados en líneas de cáncer colorrectal, diferentes a las utilizadas en nuestro trabajo han observado que la inhibición de la viabilidad celular es dependiente de la dosis y solo se detecta a partir de 20  $\mu\text{M}$  (230). Sin embargo, al evaluar el efecto de la combinación de la cloroquina con el DFO se observó la inhibición de la proliferación celular en las dos líneas tumorales a partir de 25  $\mu\text{M}$ . Otros estudios han indicado que en líneas de cáncer de pulmón al usar bajas concentraciones de cloroquina (0,25-32  $\mu\text{M}$ ), observan inhibición de la proliferación celular, pero no muerte celular hasta que se aumenta la dosis (32-64  $\mu\text{M}$ ) (232).

Nuestros resultados indican que la sinergia de estos dos fármacos genera mayor efecto en la proliferación inhibiendo el crecimiento tumoral con menor dosis de cloroquina en las líneas HCT116 y HT29 tras 72 horas de tratamiento. Esta sinergia podría ser utilizada en futuros ensayos clínicos, ya que estos fármacos son utilizados cotidianamente en otras patologías y no se observado su uso en pacientes que presenten tumores colorrectales y podría tener un potencial antitumoral mayor a otros tratamientos.

Al evaluar la combinación de la cloroquina y DFO se pudo observar que este tratamiento no modificó la expresión de HIF-1 $\alpha$ , lo que indicaría que el proceso de autofagia se induce a través de HIF-1.

El estudio de la expresión de las proteínas autofágicas en líneas celulares derivadas de CCR mostró un incremento significativo de la expresión de las proteínas LC3BII, Beclin1, BNIP3 y ATG5. Sin embargo, la expresión de la proteína mTOR y p62 disminuyó al pasar las 72 horas en exposición a esta sinergia. Las imágenes de inmunofluorescencia de la proteína p62 mostraron que tras 72 horas de tratamiento se observaban acumulaciones de la proteína en el citoplasma, lo que podría indicar la presencia de autofagosomas y como consecuencia la inhibición de la autofagia.

La cloroquina es un fármaco que impide la fusión del autofagolisosoma y la degradación de su contenido, provocando una acumulación de autofagosomas con LC3B-II en su membrana y p62 que no se degrada (233). Sin embargo, en nuestro estudio, aunque se observa la acumulación de LC3BII se evidencia la degradación de p62. Es importante destacar que en el tratamiento único con DFO la expresión de LC3BII es menor a la observada en este tratamiento.

Al evaluar la expresión de la proteína PARP se pudo ver que en las dos líneas celulares la expresión aumentó significativamente a partir de las 48 horas, lo que indica la activación del proceso de apoptosis. Otros estudios han observado que la cloroquina puede generar la inducción de la apoptosis en líneas derivadas de CCR a través de la fosforilación de MAPK (*p42/44 mitogen-activated protein*) y AKT (234).

En resumen, las líneas celulares de CCR al ser tratadas con cloroquina y DFO inhiben su crecimiento celular y una de las razones podría deberse a la inhibición de la autofagia. En este trabajo se ha visto que la proteína PARP basal incrementa su expresión, lo que puede indicar que el proceso

de apoptosis se activa con este tratamiento, sin embargo, se requieren de más estudios para poder corroborar su activación.

### **Análisis del efecto de la Panobinostat (LBH589) en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO**

Las histonas desacetilasas (HDACs) son enzimas que eliminan grupos acetilo de los residuos de lisina de las histonas y otras proteínas regulando su función. En el caso de las histonas, esta desacetilación conduce a un estado condensado de la cromatina y al silenciamiento génico (235).

El desequilibrio entre la acetilación y desacetilación de histonas está implicado en el desarrollo tumoral. La pérdida de acetilación es un evento común en tumores humanos y ocurre frecuentemente en estadios tempranos de la tumorigénesis. Las HDACs pueden regular negativamente la expresión y función de diferentes proteínas, induciendo su sobreexpresión, por lo que estas enzimas pueden ser dianas terapéuticas muy prometedoras en cáncer y la búsqueda de moléculas capaces de inhibirlas se ha convertido en una prioridad (242, 243).

El Panobinostat® (LBH589) es un pan-inhibidor de histona desacetilasa (pan-HDACi) que procede de la familia del ácido hidroxámico, el cual presenta fuerte actividad inhibitoria frente a las HDACs de clase I, II y IV. Su efecto antitumoral se debe a diversos mecanismos. Por una parte, al inhibir las HDACs de clase I, favorece la transcripción de genes supresores de tumores; por otra, actúa inhibiendo la HDAC6, una HDAC de clase IIb, localizada en el citoplasma, que desempeña un papel en el transporte de proteínas mal plegadas para su degradación en el lisosoma, causando estrés en el retículo endoplasmático generando la inducción tanto de la autofagia como de la apoptosis (237,238).

En nuestro estudio evaluamos el efecto del Panobinostat® en la viabilidad celular en líneas tumorales derivadas de CCR tanto como tratamiento único como en combinación con el mimetizador de hipoxia DFO. Al realizar el tratamiento único con el fármaco se observó la inhibición de la proliferación celular en la línea celular HCT116 a una concentración de 75 nM, mientras que en la línea HT29 fue a 100 nM tras 72 horas de tratamiento. Sin embargo, al realizar la sinergia de Panobinostat® y DFO se observó la inhibición de la proliferación celular a una concentración de 50 nM en ambas líneas celulares. Se han reportado diferentes ensayos clínicos con este fármaco tanto en tumores hematológicos como en tumores sólidos (linfoma, mieloma múltiple cáncer de páncreas entre otros) y se ha indicado que el tratamiento combinado con otros fármacos antitumorales ejerce mayores efectos antiproliferativos (245, 246). Sin embargo, los mecanismos por los cuales ocurre este efecto siguen en estudio.

En nuestro trabajo evaluamos el efecto en la viabilidad de las células HCT116 y HT29 con respecto al tratamiento único con Panobinostat®, los cuales mostraron que de manera dosis dependiente este fármaco ejerce un efecto antiproliferativo en estas líneas tumorales. Se ha descrito que el Panobinostat® posee capacidad proapoptótica en diferentes tipos tumorales (241), por lo que podríamos sugerir que este mismo proceso se activaría en las líneas derivadas de CCR. Al evaluar la expresión de la proteína PARP al realizar la sinergia de Panobinostat® y DFO hemos observado que

la expresión de dicha proteína aumentó significativamente tras 72 horas de exposición. Por lo cual, podemos sugerir que la combinación de Panobinostat y DFO puede generar el incremento de la actividad proapoptótica en estas líneas celulares.

Es importante destacar que la sinergia realizada permitió disminuir la concentración de Panobinostat® y ejercer el mismo un mayor antiproliferativo en las células derivadas de CCR. Por lo cual, este tratamiento se podría recomendar para futuros ensayos en modelos animales y posteriormente en ensayos clínicos, ya que son fármacos que se encuentran aprobados para uso clínico y la sinergia no ha sido probada en pacientes con tumores colorrectales.

En los últimos años se ha observado que los inhibidores de las enzimas desacetilasas reducen los niveles de la proteína HIF-1 $\alpha$  (242). Estudios realizados en células de cáncer de pulmón han demostrado que el Panobinosostat tanto en condiciones de normoxia como hipoxia reducen la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ , y que esta inhibición es de manera dependiente al incremento de la dosis de este fármaco (243). Por ello, evaluamos la expresión de dicha proteína al tratar las células durante 72 horas con la sinergia mencionada anteriormente. En nuestro trabajo hemos observado que la expresión de la proteína HIF1- $\alpha$  no se ve afectada por el tratamiento con Panobinostat®, lo que difiere de los resultados obtenidos en otros estudios. Basados en nuestros resultados, podemos sugerir que en las células de CCR la dosis aplicada de Panobinostat® en este tratamiento no modifica la expresión de HIF-1 $\alpha$  o que la expresión de este factor de transcripción es independiente de la acción de las enzimas HDACs y su inhibición no modifica su expresión, sin embargo, se requieren de más estudios enfocados en las enzimas HDACs para corroborar que este fármaco no ejercen ningún cambio en la expresión o degradación de la proteína HF-1 $\alpha$ .

Por su parte, el estudio de las proteínas autofágicas mostró que la sinergia genera la inducción de dicho proceso, por el aumento de la expresión de LC3B, Beclin1 y ATG5 y en el caso de las proteínas p62 y mTOR, su disminución en ambas líneas celulares. El estudio de este proceso en otras enfermedades ha descrito que el fármaco LBH589 induce autofagia (244), como es el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (245), cáncer de hígado (246) o el cáncer de colon (247). Es importante destacar que la inducción de la autofagia ya se había observado al realizar el tratamiento con DFO, por lo cual podemos sugerir que Panobinostat® tiene un efecto aditivo en la inducción de la autofagia. Se ha demostrado que en condiciones de estrés la autofagia puede presentar dos tipos de respuestas posibles, la autofagia con adaptación metabólica para la supervivencia y la autofagia que permite la muerte celular como consecuencia al fallo en la adaptación a condiciones extremas (248). En conclusión, la sinergia entre DFO y Panobinostat® induce tanto la inducción de la autofagia como la activación de la apoptosis en células derivadas de CCR y podría ser una aproximación terapéutica válida, la cual no se ha utilizado en pacientes con tumores colorrectales.

### **Análisis del efecto del paclitaxel en líneas celulares derivadas de CCR expuestas a DFO**

Paclitaxel es un terpeno, un principio activo de la familia de los taxanos, aislado de la corteza de *Taxus breuifolia* (249). Actúa promoviendo la polimerización de dímeros de tubulina para formar microtúbulos, estabilizándolos posteriormente e impidiendo su despolimerización. Actúa uniéndose a

la subunidad  $\beta$  de la tubulina, en el dominio N-terminal, por un mecanismo independiente de GTP (250). Los microtúbulos generados son anormales y generan el bloqueo del huso mitótico, la ruptura de cromosomas, la inhibición de la replicación y la migración celular. Debido a que la formación de microtúbulos ocurre durante la fase G2 y la profase de mitosis, el paclitaxel provoca una parada en G2/M y favorece la apoptosis (249).

En nuestro estudio hemos evaluado el efecto del tratamiento con paclitaxel y la sinergia de dicho fármaco con el mimetizador de hipoxia DFO. En el primer caso, hemos visto que las dos líneas disminuyen la viabilidad celular a medida que incrementa la concentración del fármaco. Sin embargo, la inhibición de la proliferación solo fue observada en la línea HCT116 a una concentración de 75 nM. Al evaluar el efecto de la sinergia del paclitaxel y DFO observamos que a la menor concentración utilizada del paclitaxel (5 nM) se observó la inhibición de la proliferación en ambas líneas celulares. Estos resultados indican que la sinergia con menor dosis de este taxano genera mayores efectos antiproliferativos a los observados al tratar las células exclusivamente con paclitaxel.

Se ha descrito que el paclitaxel presenta gran potencial antitumoral y su uso ha mejorado la respuesta al tratamiento en el cáncer de ovario, mama, pulmón de células no pequeñas, pulmón de células pequeñas, cáncer de próstata, neoplasia de cabeza y cuello, leucemia, cáncer gástrico, entre otros (254, 256–260). Sin embargo, diferentes estudios indican que altas dosis de este fármaco quimioterapéutico puede generar numerosos efectos secundarios, tales como reacciones de hipersensibilidad, neutropenia entre otros (256). Por lo cual la sinergia utilizada permitiría generar menores efectos secundarios generados por este terpeno. Es importante destacar que el paclitaxel se acumula intracelularmente de 50 a 1000 veces más dependiendo del tipo celular y de la concentración añadida y se ha demostrado que su acumulación es mucho mayor en tumores que en el plasma (257). Por lo cual, es necesario realizar diferentes ensayos en modelos animales para lograr establecer con claridad las dosis correctas para esta sinergia y así poder aplicarse en futuros ensayos clínicos en pacientes con tumores colorrectales.

Múltiples estudios han descrito que este taxano puede generar un bloqueo en células en la fase G2/M en diferentes tipos tumorales (258). Por ello, evaluamos el ciclo celular al tratar a las células la sinergia de paclitaxel y DFO. Nuestros resultados mostraron que en las células tratadas con estos dos fármacos ocurrió un bloqueo en la fase G1/0 a las 24 horas de exposición, sin embargo, tras 72 horas de tratamiento observamos el incremento de la muerte celular hasta más del 40% en las dos líneas celulares. El bloqueo de células en G1/0 ha sido descrito en múltiples tipos tumorales como un efecto del tratamiento con el DFO, evitando que la mayoría de las células entren en fase S o G2/M (235). Además, al evaluar la expresión de PARP frente al tiempo en que las células fueron tratadas con esta sinergia, se pudo observar un aumento significativo a partir de las 24 horas de tratamiento, lo que puede sugerir la activación del proceso de apoptosis.

Se ha descrito que el paclitaxel puede inducir apoptosis y también inhibir la autofagia. En células mitóticas, este compuesto bloquea la proteína Vps34, impidiendo la iniciación del autofagosoma. En



células no mitóticas, el paclitaxel inhibe el movimiento del autofagosoma, impidiendo su maduración y fusión con el lisosoma (260).

El estudio realizado tanto de la proteína HIF-1 $\alpha$  como en las proteínas involucradas en la autofagia con la sinergia en las líneas de CCR muestran el aumento de Beclin1 y la disminución de mTOR, el aumento de la expresión de LC3B y la disminución de p62. Además, la expresión de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y BNIP3. Resultados similares se observaron en nuestro trabajo al realizar el tratamiento con DFO exclusivamente, lo que indica que la adición del paclitaxel no genera la inhibición de la autofagia. En conclusión, el tratamiento combinado con DFO y paclitaxel induce la autofagia y la apoptosis conllevando a la muerte celular tras solo 72 horas de tratamiento, por lo cual sería una buena aproximación terapéutica para este tipo de tumor



1. El estudio de polimorfismos de genes implicados en autofagia muestra que estas variantes genéticas no se asocian a la susceptibilidad a desarrollar cáncer colorrectal.
2. Nuestros resultados muestran que las células tumorales derivadas de CCR expuestas tanto a hipoxia física como química generan el aumento de expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$ . Esta sobreexpresión permite la transcripción de genes necesarios para la activación de diferentes vías de señalización que conlleva a la supervivencia celular
3. El estudio realizado sobre el mecanismo de la autofagia indica que las células tumorales derivadas de CCR inducen este proceso tanto en condiciones de hipoxia como en presencia del quelante DFO, lo cual podría ser uno de los mecanismos por los cuales estas células evitan la muerte celular.
4. Los estudios de fármacos en líneas celulares de CCR realizados en este trabajo confirman que el uso del mimetizador de hipoxia DFO junto con Decitabina®, Panobinostat®, cloroquina, metformina y paclitaxel tiene una actividad antiproliferativa y generan muerte celular, por lo que estas combinaciones podrían emplearse como tratamientos terapéuticos para este tipo de tumor.



## **BIBLIOGRAFÍA**

---

1. Rubin H. Fields and field cancerization: The preneoplastic origins of cancer. *BioEssays*. 2011 Mar 1;33(3):224–31.
2. WorldCancerReport.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 30]. Available from: <https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2003/WorldCancerReport.pdf>
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
4. KS-HA-16-001-EN-N.pdf [Internet]. [cited 2017 Mar 30]. Available from: <http://ec.europa.eu/eurostat/documents/3217494/7604195/KS-HA-16-001-EN-N.pdf>
5. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359–86.
6. Las\_cifras\_del\_cancer\_en\_Esp\_2017.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 1]. Available from: [http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las\\_cifras\\_del\\_cancer\\_en\\_Esp\\_2017.pdf](http://www.seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_cifras_del_cancer_en_Esp_2017.pdf)
7. [cited 2017 Apr 6]. Available from: <http://sci-hub.cc/10.3322/caac.20038>
8. Arvelo F, Sojo F, Cotte C. Biology of colorectal cancer. *ecancermedicalsecience* [Internet]. 2015 Apr 9 [cited 2017 Mar 28];9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4404039/>
9. Medical and Scientific Illustration Washington, DC -Terese Winslow [Internet]. [cited 2017 Apr 1]. Available from: <http://www.teresewinslow.com/index.asp>
10. Marley AR, Nan H. Epidemiology of colorectal cancer. *Int J Mol Epidemiol Genet*. 2016 Sep 30;7(3):105–14.
11. Li J, Guo B-C, Sun L-R, Wang J-W, Fu X-H, Zhang S-Z, et al. TNM staging of colorectal cancer should be reconsidered by T stage weighting. *World J Gastroenterol*. 2014 May 7;20(17):5104–12.
12. Rodríguez-Salas N, Domínguez G, Barderas R, Mendiola M, García-Albéniz X, Maurel J, et al. Clinical relevance of colorectal cancer molecular subtypes. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Jan;109:9–19.
13. Morillas JD, Castells A, Oriol I, Pastor A, Pérez-Segura P, Echevarría JM, et al. Alianza para la Prevención del Cáncer de Colon en España: un compromiso cívico con la sociedad. *Gastroenterol Hepatol*. 2012 Mar 1;35(3):109–28.
14. Nagtegaal ID, Quirke P, Schmol H-J. Has the new TNM classification for colorectal cancer improved care? *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 18;9(2):119–23.
15. García H, Marina O, Wood Rodríguez L, Galbán García E, Vázquez A, Rosario M del. Factores de riesgo para el cáncer colorrectal. *Rev Cuba Med*. 2011 Jun;50(2):118–32.
16. Kim TJ, Kim JE, Choi Y-H, Hong SN, Kim Y-H, Chang DK, et al. Obesity-related parameters and colorectal adenoma development. *J Gastroenterol*. 2017 Feb 14;
17. MOJS-02-00015.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 8]. Available from: <http://medcraveonline.com/MOJS/MOJS-02-00015.pdf>
18. OMS | El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer evalúa el consumo de la carne roja y de la carne procesada [Internet]. WHO. [cited 2017 Sep 25]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/cancer-red-meat/es/>
19. Dermadi D, Valo S, Ollila S, Soliymani R, Sipari N, Pussila M, et al. Western Diet Deregulates Bile Acid Homeostasis, Cell Proliferation, and Tumorigenesis in Colon. *Cancer Res*. 2017 Jun 15;77(12):3352–63.
20. [cited 2017 Apr 11]. Available from: <http://sci-hub.cc/10.1038/ajg.2016.589>
21. Ben Q, Wang L, Liu J, Qian A, Wang Q, Yuan Y. Alcohol drinking and the risk of colorectal adenoma: a dose-response meta-analysis. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. 2015 Jul;24(4):286–95.
22. art%3A10.1007%2Fs10552-017-0882-2.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 12]. Available from: <http://download.springer.com/static/pdf/435/art%253A10.1007%252Fs10552-017-0882->

- 2.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2Fs10552-017-0882-2&token2=exp=1492008703~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F435%2Fart%25253A10.1007%25252Fs10552-017-0882-2.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252Fs10552-017-0882-2\*~hmac=26e0fbf0f6a862b80c7e3ec97dba310f7ff71bfa0c5b9c7f926e154456ec525b
23. Ghorbanoghli Z, Jabari C, Sweidan W, Hammoudeh W, Cortas G, Sharara AI, et al. A new hereditary colorectal cancer network in the Middle East and eastern mediterranean countries to improve care for high-risk families. *Fam Cancer*. 2017 Jul 6;1–4.
  24. Giglia MD, Chu DI. Familial Colorectal Cancer: Understanding the Alphabet Soup. *Clin Colon Rectal Surg*. 2016 Sep;29(3):185–95.
  25. Valle L. Genetic predisposition to colorectal cancer: Where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol WJG*. 2014 Aug 7;20(29):9828–49.
  26. Hansen MF, Johansen J, Bjørnevoll I, Sylvander AE, Steinsbekk KS, Sætrum P, et al. A novel POLE mutation associated with cancers of colon, pancreas, ovaries and small intestine. *Fam Cancer*. 2015;14(3):437–48.
  27. Rohlin A, Eiengård F, Lundstam U, Zagoras T, Nilsson S, Edsjö A, et al. GREM 1 and POLE variants in hereditary colorectal cancer syndromes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2016 Jan;55(1):95–106.
  28. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, Broderick P, et al. Germline mutations in the proof-reading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*. 2013 Feb;45(2):136–44.
  29. [cited 2017 Apr 15]. Available from: <http://sci-hub.cc/10.1053/j.gastro.2017.02.011>
  30. Jun S-Y, Lee E-J, Kim M-J, Chun SM, Bae YK, Hong SU, et al. Lynch syndrome-related small intestinal adenocarcinomas. *Oncotarget*. 2017 Feb 11;8(13):21483–500.
  31. Jeppesen DK, Bohr VA, Stevnsner T. DNA Repair Deficiency in Neurodegeneration. *Prog Neurobiol*. 2011 Jul;94(2):166–200.
  32. revision1.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 15]. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v29n1/revision1.pdf>
  33. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453–6.
  34. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):261–8.
  35. Waller A, Findeis S, Lee MJ. Familial Adenomatous Polyposis. *J Pediatr Genet*. 2016 Jun;5(2):78–83.
  36. Sandoval IT, Delacruz RGC, Miller BN, Hill S, Olson KA, Gabriel AE, et al. A metabolic switch controls intestinal differentiation downstream of Adenomatous polyposis coli (APC). *eLife* [Internet]. [cited 2017 Apr 17];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388534/>
  37. Talseth-Palmer BA. The genetic basis of colonic adenomatous polyposis syndromes. *Hered Cancer Clin Pract* [Internet]. 2017 Mar 16 [cited 2017 Apr 17];15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5353802/>
  38. Ikenoue T, Yamaguchi K, Komura M, Imoto S, Yamaguchi R, Shimizu E, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis with desmoids caused by an APC mutation. *Hum Genome Var*. 2015 Mar 26;2:15011.
  39. Grandval P, Fabre AJ, Gaildrat P, Baert-Desurmont S, Blayau M, Buisine M-P, et al. Genomic variations integrated database for MUTYH-associated adenomatous polyposis. *J Med Genet*. 2015 Jan;52(1):25–7.
  40. SAITO-DIAZ K, CHEN TW, WANG X, THORNE CA, WALLACE HA, PAGE-MCCAW A, et al. The way Wnt works: Components and mechanism. *Growth Factors Chur Switz*. 2013 Feb;31(1):1–31.

41. revision1.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 18]. Available from: <http://scielo.isciii.es/pdf/asisna/v29n1/revision1.pdf>
42. NEJM199312303292701.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 20]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM199312303292701>
43. Lopez-Ceron M, Pellise M. Biology and diagnosis of aberrant crypt foci. *Colorectal Dis Off J Assoc Coloproctology G B Irel.* 2012 Apr;14(4):e157-164.
44. PDQ Cancer Genetics Editorial Board. Genetics of Colorectal Cancer (PDQ®): Health Professional Version. In: PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002 [cited 2017 Apr 20]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK126744/>
45. Alizadeh AM, Shiri S, Farsinejad S. Metastasis review: from bench to bedside. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 2014 Sep;35(9):8483–523.
46. a08v37n2.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 20]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rcbc/v37n2/a08v37n2.pdf>
47. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Pradilla Dieste A, Cerrada E, Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci [Internet].* 2017 Jan 19 [cited 2017 Apr 25];18(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297828/>
48. Pino MS, Chung DC. THE CHROMOSOMAL INSTABILITY PATHWAY IN COLON CANCER. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2059–72.
49. Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):479–507.
50. Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A Mechanism Linking Extra Centrosomes to Chromosomal Instability. *Nature.* 2009 Jul 9;460(7252):278–82.
51. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in... : *European Journal of Cancer Prevention [Internet].* LWW. [cited 2017 Jun 14]. Available from: [http://journals.lww.com/eurjcancerprev/Fulltext/2014/07000/Mismatch\\_repair\\_pathway\\_\\_\\_molecules,\\_functions,.3.a.spx](http://journals.lww.com/eurjcancerprev/Fulltext/2014/07000/Mismatch_repair_pathway___molecules,_functions,.3.a.spx)
52. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2003 Mar 15;21(6):1174–9.
53. Perea J, Lomas M, Hidalgo M. Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev Espanola Enfermedades Dig Organo Of Soc Espanola Patol Dig.* 2011 Jan;103(1):29–35.
54. Poulogiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome. *Histopathology.* 2010 Jan;56(2):167–79.
55. Kocarnik JM, Shiovitz S, Phipps AI. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications. *Gastroenterol Rep.* 2015 Nov;3(4):269–76.
56. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2073–2087.e3.
57. Lee C-T, Huang Y-C, Hung L-Y, Chow N-H, Su P-F, Ho C-L, et al. Serrated adenocarcinoma morphology in colorectal mucinous adenocarcinoma is associated with improved patient survival. *Oncotarget [Internet].* 2017 Apr 4 [cited 2017 Apr 25];5(0). Available from: [http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path\[\]=16815&pubmed-linkout=1](http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path[]=16815&pubmed-linkout=1)
58. DeBerardinis RJ, Chandel NS. Fundamentals of cancer metabolism. *Sci Adv [Internet].* 2016 May 27;2(5). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4928883/>
59. Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science.* 2009 May 22;324(5930):1029–33.

60. a11v24n3.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 30]. Available from: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/acta\\_medica/2007\\_n3/pdf/a11v24n3.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/acta_medica/2007_n3/pdf/a11v24n3.pdf)
61. 1-s2.0-S0092867408010660-main.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 27]. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0092867408010660/1-s2.0-S0092867408010660-main.pdf?\\_tid=a3a95ecc-2b69-11e7-abd1-00000aacb35f&acdnat=1493312017\\_b61b859816ddf3b9ac85657c86d2e501](http://ac.els-cdn.com/S0092867408010660/1-s2.0-S0092867408010660-main.pdf?_tid=a3a95ecc-2b69-11e7-abd1-00000aacb35f&acdnat=1493312017_b61b859816ddf3b9ac85657c86d2e501)
62. 03\_revision1.pdf [Internet]. [cited 2017 May 9]. Available from: [http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v33n9/03\\_revision1.pdf](http://scielo.isciii.es/pdf/aue/v33n9/03_revision1.pdf)
63. Wouters BG, Koritzinsky M. Hypoxia signalling through mTOR and the unfolded protein response in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008 Nov;8(11):851–64.
64. v66n2a15.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 29]. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v66n2/v66n2a15.pdf>
65. 1153.pdf [Internet]. [cited 2017 Apr 27]. Available from: <https://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/viewFile/1126/1153>
66. Wragg JW, Durant S, McGettrick HM, Sample KM, Egginton S, Bicknell R. Shear Stress Regulated Gene Expression and Angiogenesis in Vascular Endothelium. *Microcirculation*. 2014 May 1;21(4):290–300.
67. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378–89.
68. 15117.full.pdf [Internet]. [cited 2017 May 6]. Available from: <http://www.jbc.org/content/271/25/15117.full.pdf>
69. 967.full.pdf [Internet]. [cited 2017 May 8]. Available from: <http://physrev.physiology.org/content/physrev/92/3/967.full.pdf>
70. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2001 Jun 1;11(3):293–9.
71. Biology of HIF-1[alpha] (PDF Download Available) [Internet]. ResearchGate. [cited 2017 May 8]. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/5593415\\_Biology\\_of\\_HIF-1alpha](https://www.researchgate.net/publication/5593415_Biology_of_HIF-1alpha)
72. v66n2a15.pdf [Internet]. [cited 2017 May 9]. Available from: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v66n2/v66n2a15.pdf>
73. 1337.full.pdf [Internet]. [cited 2017 May 9]. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/sci/294/5545/1337.full.pdf>
74. N M, C W, Ph M, Cw P, Pj R. Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J*. 2001 Sep;20(18):5197–206.
75. 464.full.pdf [Internet]. [cited 2017 May 16]. Available from: <http://science.sciencemag.org/content/sci/292/5516/464.full.pdf>
76. Mandl M, Depping R. Hypoxia-Inducible Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) (HIF-1 $\beta$ ): Is It a Rare Exception? *Mol Med*. 2014 May 27;20(1):215–20.
77. Carroll VA, Ashcroft M. Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med*. 2005 Apr 15;7(6):1–16.
78. Chang H, Li X, Cai Q, Li C, Tian L, Chen J, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway is involved in CVB3-induced autophagy of HeLa cells. *Int J Mol Med*. 2017 Jul 1;40(1):182–92.
79. Sparks C, Guertin D. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene*. 2010 Jul 1;29(26):3733–44.
80. Durán RV, Hall MN. Regulation of TOR by small GTPases. *EMBO Rep*. 2012 Feb;13(2):121–8.
81. Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*. 2009 May;29(10):2570–81.



82. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):931–7.
83. Groulx J-F, Khalfaoui T, Benoit YD, Bernatchez G, Carrier JC, Basora N, et al. Autophagy is active in normal colon mucosa. *Autophagy.* 2012 Jun;8(6):893–902.
84. Juenemann K, Reits EA. Alternative Macroautophagic Pathways. *Int J Cell Biol.* 2012 Mar 27;2012:e189794.
85. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell.* 2004 Mar;15(3):1101–11.
86. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9.
87. Botti-Millet J, Nascimbeni AC, Dupont N, Morel E, Codogno P. Fine-tuning autophagy: from transcriptional to posttranslational regulation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Sep 1;311(3):C351-362.
88. Experimental & Molecular Medicine - Abstract of article: Molecules and their functions in autophagy [Internet]. [cited 2017 Nov 8]. Available from: <https://www.nature.com/emm/journal/v44/n2/abs/emm201211a.html>
89. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* 2010 May 1;221(1):3–12.
90. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct;9(10):1102–9.
91. He C, Klionsky DJ. Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu Rev Genet.* 2009;43(1):67–93.
92. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ.* 2005;12(S2):1542–52.
93. Velikkakath AKG, Nishimura T, Oita E, Ishihara N, Mizushima N. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell.* 2012 Mar;23(5):896–909.
94. Raiborg C, Stenmark H. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 2009 Mar 26;458(7237):445–52.
95. Jäger S, Bucci C, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Saftig P, et al. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J Cell Sci.* 2004 Sep 15;117(20):4837–48.
96. Wesselborg S, Stork B. Autophagy signal transduction by ATG proteins: from hierarchies to networks. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72:4721–57.
97. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic Cph Den.* 2008 Apr;9(4):574–87.
98. Köchl R, Hu XW, Chan EYW, Tooze SA. Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes. *Traffic.* 2006 Feb 1;7(2):129–45.
99. White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5037–46.
100. Ruocco N, Costantini S, Costantini M. Blue-Print Autophagy: Potential for Cancer Treatment. *Mar Drugs* [Internet]. 2016 Jul 21;14(7). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4962028/>
101. Liu J, Debnath J. The Evolving, Multifaceted Roles of Autophagy in Cancer. *Adv Cancer Res.* 2016;130:1–53.
102. White E, DiPaola RS. The Double-edged Sword of Autophagy Modulation in Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5308–16.

103. Thorburn A. Autophagy and its effects: making sense of double-edged swords. *PLoS Biol.* 2014 Oct;12(10):e1001967.
104. Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev.* 2011 Oct 1;25(19):1999–2010.
105. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012 Jun 1;12(6):401–10.
106. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest.* 2015 Jan 2;125(1):42–6.
107. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of Cells and Tissues. *Cell.* 2011 Nov 11;147(4):728–41.
108. Donohue E, Balgi AD, Komatsu M, Roberge M. Induction of Covalently Crosslinked p62 Oligomers with Reduced Binding to Polyubiquitinated Proteins by the Autophagy Inhibitor Verteporfin. *PLOS ONE.* 2014 Dec 10;9(12):e114964.
109. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy.* 2011 Mar;7(3):279–96.
110. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol.* 2010 Dec 1;32(4):431–6.
111. Mathew R, Karp C, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, et al. Autophagy Suppresses Tumorigenesis Through Elimination of p62. *Cell.* 2009 Jun 12;137(6):1062–75.
112. Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science.* 2008 Mar 7;319(5868):1352–5.
113. Chen H-Y, White E. Role of Autophagy in Cancer Prevention. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 2011 Jul 1;4(7):973–83.
114. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006 Jul;10(1):51–64.
115. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, et al. Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell.* 2005 Jan 28;120(2):237–48.
116. Jin S, DiPaola RS, Mathew R, White E. Metabolic catastrophe as a means to cancer cell death. *J Cell Sci.* 2007 Feb 1;120(Pt 3):379–83.
117. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem.* 2007 Aug 17;282(33):24131–45.
118. Ha J, Kim J. Novel pharmacological modulators of autophagy: an updated patent review (2012-2015). *Expert Opin Ther Pat.* 2016 Nov 1;26(11):1273–89.
119. Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* 2013 Oct 10;4:e838.
120. Yang Y, Hu L, Zheng H, Mao C, Hu W, Xiong K, et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May;34(5):625–35.
121. Gao L, Jauregui CE, Teng Y. Targeting autophagy as a strategy for drug discovery and therapeutic modulation. *Future Med Chem.* 2017 Feb 8;9(3):335–45.
122. Li X, Xu H, Liu Y, An N, Zhao S, Bao J. Autophagy modulation as a target for anticancer drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2013 May;34(5):612–24.
123. Nagelkerke A, Bussink J, Geurts-Moespot A, Sweep FCGJ, Span PN. Therapeutic targeting of autophagy in cancer. Part II: pharmacological modulation of treatment-induced autophagy. *Semin Cancer Biol.* 2015 Apr;31:99–105.
124. Cheng Y, Ren X, Hait WN, Yang J-M. Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 2013;65(4):1162–97.

125. Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, et al. Chloroquine Promotes Apoptosis in Melanoma Cells by Inhibiting BH3 Domain–Mediated PUMA Degradation. *J Invest Dermatol*. 2013 Sep 1;133(9):2247–54.
126. Hu T, Li P, Luo Z, Chen X, Zhang J, Wang C, et al. Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep*. 2016;35(1):43–9.
127. Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Hipoxia tumoral: Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp*. 2009 Oct;33(9):941–51.
128. Pursiheimo J-P, Rantanen K, Heikkinen PT, Johansen T, Jaakkola PM. Hypoxia-activated autophagy accelerates degradation of SQSTM1/p62. *Oncogene*. 2008 Oct 20;28(3):334–44.
129. Afonina I, Zivarts M, Kutyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB. Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jul 1;25(13):2657–60.
130. Wang Y, Wang Y, Zhang L, Li M, Luo L, Liu D, et al. Endonuclease Restriction-Mediated Real-Time Polymerase Chain Reaction: A Novel Technique for Rapid, Sensitive and Quantitative Detection of Nucleic-Acid Sequence. *Front Microbiol* [Internet]. 2016 Jul 13;7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4942466/>
131. 323\_329.pdf [Internet]. [cited 2017 Jun 2]. Available from: [http://www.sefh.es/revistas/vol19/n6/323\\_329.PDF](http://www.sefh.es/revistas/vol19/n6/323_329.PDF)
132. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1–2):55–63.
133. Liang C-C, Park AY, Guan J-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc*. 2007 Feb;2(2):329–33.
134. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680–5.
135. Heng HH, Tsui LC. Modes of DAPI banding and simultaneous in situ hybridization. *Chromosoma*. 1993 May;102(5):325–32.
136. Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac Sanit*. 2005 Aug 1;19(4):333–41.
137. Lai M-C, Chang C-M, Sun HS. Hypoxia Induces Autophagy through Translational Up-Regulation of Lysosomal Proteins in Human Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2016 Apr 14;11(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4831676/>
138. Brard L, Granai CO, Swamy N. Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006 Jan;100(1):116–27.
139. Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, et al. Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1- phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nat Cell Biol*. 2009 Apr;11(4):468–76.
140. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation | Annual Review of Cell and Developmental Biology [Internet]. [cited 2017 Sep 11]. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
141. Pyo J-O, Nah J, Jung Y-K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med*. 2012 Feb 29;44(2):73–80.
142. Fernández-Mateos J, Seijas-Tamayo R, Klain JCA, Borgoñón MP, Pérez-Ruiz E, Mesía R, et al. Analysis of autophagy gene polymorphisms in Spanish patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2017 Jul 31;7(1):6887.
143. Burada F, Nicoli ER, Ciurea ME, Uscatu DC, Ioana M, Gheonea DI. Autophagy in colorectal cancer: An important switch from physiology to pathology. *World J Gastrointest Oncol*. 2015 Nov 15;7(11):271–84.

144. Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Itakura E, Mizushima N. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. *J Cell Sci*. 2014 Sep 15;127(18):4089–102.
145. Songane M, Kleinnijenhuis J, Alisjahbana B, Sahiratmadja E, Parwati I, Oosting M, et al. Polymorphisms in Autophagy Genes and Susceptibility to Tuberculosis. *PLOS ONE*. 2012 Aug 6;7(8):e41618.
146. Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, et al. A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet*. 2009 Nov;41(11):1228–33.
147. Usategui-Martín R, García-Aparicio J, Corral-Gudino L, Calero-Paniagua I, Pino-Montes JD, Sarmiento RG. Polymorphisms in Autophagy Genes Are Associated with Paget Disease of Bone. *PLOS ONE*. 2015 Jun 1;10(6):e0128984.
148. White KAM, Luo L, Thompson TA, Torres S, Hu CA, Thomas NE, et al. Variants in autophagy-related genes and clinical characteristics in melanoma: a population-based study. *Cancer Med*. 2016 Oct 17;5(11):3336–45.
149. Kang MR, Kim MS, Oh JE, Kim YR, Song SY, Kim SS, et al. Frameshift mutations of autophagy-related genes ATG2B, ATG5, ATG9B and ATG12 in gastric and colorectal cancers with microsatellite instability. *J Pathol*. 2009 Apr 1;217(5):702–6.
150. Grimm WA, Messer JS, Murphy SF, Nero T, Lodolce JP, Weber CR, et al. The Thr300Ala variant in ATG16L1 is associated with improved survival in human colorectal cancer and enhanced production of type I interferon. *Gut*. 2015 Feb 2;gutjnl-2014-308735.
151. Murthy A, Li Y, Peng I, Reichelt M, Katakam AK, Noubade R, et al. A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature*. 2014 Feb 27;506(7489):456–62.
152. Burada F, Ciurea ME, Nicoli R, Streata I, Vilcea ID, Rogoveanu I, et al. ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility. *Pathol Oncol Res*. 2016 Apr 1;22(2):317–22.
153. Salem M, Ammitzboell M, Nys K, Seidelin JB, Nielsen OH. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy*. 2015 Apr 3;11(4):585–94.
154. Burada F, Ciurea ME, Nicoli R, Streata I, Vilcea ID, Rogoveanu I, et al. ATG16L1 T300A Polymorphism is Correlated with Gastric Cancer Susceptibility. *Pathol Oncol Res*. 2016 Apr 1;22(2):317–22.
155. Ningappa M, Higgs BW, Weeks DE, Ashokkumar C, Duerr RH, Sun Q, et al. NOD2 Gene Polymorphism rs2066844 Associates With Need for Combined Liver–Intestine Transplantation in Children With Short-Gut Syndrome. *Am J Gastroenterol*. 2011 Jan;106(1):157.
156. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998 Sep 24;395(6700):395–8.
157. Freire P, Figueiredo P, Cardoso R, Donato MM, Sá A, Portela F, et al. Card15 mutations and gastric cancer in a Portuguese population. *Scand J Gastroenterol*. 2013 Oct 1;48(10):1188–97.
158. Hugot J-P, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nat Lond*. 2001;411(6837):599–603.
159. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, et al. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4, CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population. *World J Gastroenterol WJG*. 2005 Feb 7;11(5):681–5.
160. Branquinho D, Freire P, Sofia C. NOD2 mutations and colorectal cancer - Where do we stand? *World J Gastrointest Surg*. 2016 Apr 27;8(4):284–93.
161. Liu J, He C, Xu Q, Xing C, Yuan Y. NOD2 Polymorphisms Associated with Cancer Risk: A Meta-Analysis. *PLoS ONE [Internet]*. 2014 Feb 20;9(2). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3930717/>
162. Jackson AL, Loeb LA. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2001 Jun 2;477(1–2):7–21.

163. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front Immunol*. 2013 Oct 16;4:333.
164. Travassos LH, Carneiro LAM, Ramjeet M, Hussey S, Kim Y-G, Magalhães JG, et al. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat Immunol*. 2010 Jan;11(1):55–62.
165. Mizukami Y, Chung DC. Hypoxia, angiogenesis, and colorectal cancer. *Curr Colorectal Cancer Rep*. 2007 May 1;3(2):71–5.
166. Yao KS, Xanthoudakis S, Curran T, O'Dwyer PJ. Activation of AP-1 and of a nuclear redox factor, Ref-1, in the response of HT29 colon cancer cells to hypoxia. *Mol Cell Biol*. 1994 Sep;14(9):5997–6003.
167. Yang X, Cheng Y, Jia J, Cao X, Yang Y. Effect of long-term exposure to hypoxia on the proliferation of colon cancer cells in vitro. *TUMOR*. 2013 Jan 25;33(1):42–7.
168. Kim JL, Lee D-H, Na YJ, Kim BR, Jeong YA, Lee SI, et al. Iron chelator-induced apoptosis via the ER stress pathway in gastric cancer cells. *Tumor Biol*. 2016 Jul 1;37(7):9709–19.
169. Buss JL, Torti FM, Torti SV. The role of iron chelation in cancer therapy. *Curr Med Chem*. 2003 Jun;10(12):1021–34.
170. Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jul;1790(7):702–17.
171. Brard L, Granai CO, Swamy N. Iron chelators deferoxamine and diethylenetriamine pentaacetic acid induce apoptosis in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*. 2006 Jan;100(1):116–27.
172. Dantzer F, Amé J-C, Schreiber V, Nakamura J, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol*. 2006;409:493–510.
173. Chen Y-C, Shen S-C, Lee W-R, Hsu F-L, Lin H-Y, Ko C-H, et al. Emodin induces apoptosis in human promyeloleukemic HL-60 cells accompanied by activation of caspase 3 cascade but independent of reactive oxygen species production. *Biochem Pharmacol*. 2002 Dec 15;64(12):1713–24.
174. Edinger AL, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Dec;16(6):663–9.
175. Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 May;4(5):421–40.
176. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-Stress-Mediated Apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec 1;1010(1):186–94.
177. Higgins DF, Kimura K, Bernhardt WM, Shrimanker N, Akai Y, Hohenstein B, et al. Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 2007 Dec 3;117(12):3810–20.
178. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1776–84.
179. Zhang W, Zhang W, Wu Y, Wu Y, Yan Q, Yan Q, et al. Deferoxamine enhances cell migration and invasion through promotion of HIF-1 $\alpha$  expression and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2014 Jan 1;31(1):111–6.
180. Luo Y, He D, Ning L, Shen S, Li L, Li X. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  induces the epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer cells. *Chin Med J (Engl)*. 2006 May 5;119(9):713–8.
181. Liu Y, Cui Y, Shi M, Zhang Q, Wang Q, Chen X. Deferoxamine Promotes MDA-MB-231 Cell Migration and Invasion through Increased ROS-Dependent HIF-1 $\alpha$  Accumulation. *Cell Physiol Biochem*. 2014;33(4):1036–46.
182. Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, et al. Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *J Surg Res*. 2013 Jun 1;182(1):75–84.

183. HIF-1 $\alpha$  Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis through Direct Regulation of ZEB1 in Colorectal Cancer [Internet]. [cited 2017 Sep 19]. Available from: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0129603>
184. Masoud GN, Li W. HIF-1 $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 2015 Sep;5(5):378–89.
185. Moon J-H, Jeong J-K, Park S-Y. Deferoxamine inhibits TRAIL-mediated apoptosis via regulation of autophagy in human colon cancer cells. *Oncol Rep*. 2015 Mar 1;33(3):1171–6.
186. Greijer AE, Wall E van der. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*. 2004 Oct 1;57(10):1009–14.
187. Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, et al. Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *J Surg Res*. 2013 Jun 1;182(1):75–84.
188. Mazure NM, Pouyssegur J. Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr 1;22(2):177–80.
189. Zhang J, Ney PA. ROLE OF BNIP3 AND NIX IN CELL DEATH, AUTOPHAGY, AND MITOPHAGY. *Cell Death Differ*. 2009 Jul;16(7):939–46.
190. Feng C-C, Lin C-C, Lai Y-P, Chen T-S, Marthandam Asokan S, Lin J-Y, et al. Hypoxia suppresses myocardial survival pathway through HIF-1 $\alpha$ -IGFBP-3-dependent signaling and enhances cardiomyocyte autophagic and apoptotic effects mainly via FoxO3a-induced BNIP3 expression. *Growth Factors Chur Switz*. 2016 Aug;34(3–4):73–86.
191. Marin JJG, Lozano E, Perez MJ. Lack of mitochondrial DNA impairs chemical hypoxia-induced autophagy in liver tumor cells through ROS-AMPK-ULK1 signaling dysregulation independently of HIF-1 $\alpha$ . *Free Radic Biol Med*. 2016 Dec;101:71–84.
192. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*. 2008 Apr 18;283(16):10892–903.
193. Mazure NM, Pouyssegur J. Atypical BH3-domains of BNIP3 and BNIP3L lead to autophagy in hypoxia. *Autophagy*. 2009 Aug 16;5(6):868–9.
194. Hu Y-L, DeLay M, Jahangiri A, Molinaro AM, Rose SD, Carbonell WS, et al. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma. *Cancer Res*. 2012 Apr 1;72(7):1773–83.
195. Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson ÅB. Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J Biol Chem*. 2012 Jan 6;287(23):19094–104.
196. Dayan F, Bilton RL, Laferrière J, Trottier E, Roux D, Pouyssegur J, et al. Activation of HIF-1 $\alpha$  in exponentially growing cells via hypoxic stimulation is independent of the Akt/mTOR pathway. *J Cell Physiol*. 2009 Jan;218(1):167–74.
197. Tinton SA, Buc-Calderon PM. Hypoxia increases the association of 4E-binding protein 1 with the initiation factor 4E in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*. 1999 Mar 5;446(1):55–9.
198. Wolff NC, Vega-Rubin-de-Celis S, Xie X-J, Castrillon DH, Kabbani W, Brugarolas J. Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia. *Mol Cell Biol*. 2011 May;31(9):1870–84.
199. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a patient-centered approach: position statement of the American Diabetes Association (ADA) and the European Association for the Study of Diabetes (EASD). *Diabetes Care*. 2012 Jun;35(6):1364–79.
200. Kirpichnikov D, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002 Jul 2;137(1):25–33.

201. Evans JMM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ*. 2005 Jun 4;330(7503):1304–5.
202. Libby G, Donnelly LA, Donnan PT, Alessi DR, Morris AD, Evans JMM. New users of metformin are at low risk of incident cancer: a cohort study among people with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009 Sep;32(9):1620–5.
203. Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GFM, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PloS One*. 2013;8(8):e71583.
204. Pollak MN. Investigating metformin for cancer prevention and treatment: the end of the beginning. *Cancer Discov*. 2012 Sep;2(9):778–90.
205. Leone A, Di Gennaro E, Bruzzese F, Avallone A, Budillon A. New perspective for an old antidiabetic drug: metformin as anticancer agent. *Cancer Treat Res*. 2014;159:355–76.
206. Zhang D, Xuan J, Zheng B-B, Zhou Y-L, Lin Y, Wu Y-S, et al. Metformin Improves Functional Recovery After Spinal Cord Injury via Autophagy Flux Stimulation. *Mol Neurobiol*. 2017 Jul;54(5):3327–41.
207. Takahashi A, Kimura F, Yamanaka A, Takebayashi A, Kita N, Takahashi K, et al. Metformin impairs growth of endometrial cancer cells via cell cycle arrest and concomitant autophagy and apoptosis. *Cancer Cell Int*. 2014;14:53.
208. Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, et al. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*. 2008 Jun 5;27(25):3576–86.
209. Wang L-W, Li Z-S, Zou D-W, Jin Z-D, Gao J, Xu G-M. Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 21;14(47):7192–8.
210. Gotlieb WH, Saumet J, Beauchamp M-C, Gu J, Lau S, Pollak MN, et al. In vitro metformin anti-neoplastic activity in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2008 Aug;110(2):246–50.
211. Cantrell LA, Zhou C, Mendivil A, Malloy KM, Gehrig PA, Bae-Jump VL. Metformin is a potent inhibitor of endometrial cancer cell proliferation--implications for a novel treatment strategy. *Gynecol Oncol*. 2010 Jan;116(1):92–8.
212. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, et al. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *eLife [Internet]*. 2014 May 13;3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4017650/>
213. Guimarães TA, Farias LC, Santos ES, de Carvalho Fraga CA, Orsini LA, de Freitas Teles L, et al. Metformin increases PDH and suppresses HIF-1 $\alpha$  under hypoxic conditions and induces cell death in oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Aug 23;7(34):55057–68.
214. Zhou X, Chen J, Yi G, Deng M, Liu H, Liang M, et al. Metformin suppresses hypoxia-induced stabilization of HIF-1 $\alpha$  through reprogramming of oxygen metabolism in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2015 Nov 28;7(1):873–84.
215. Kuban-Jankowska A, Sahu KK, Gorska-Ponikowska M, Tuszynski JA, Wozniak M. Inhibitory Activity of Iron Chelators ATA and DFO on MCF-7 Breast Cancer Cells and Phosphatases PTP1B and SHP2. *Anticancer Res*. 2017;37(9):4799–806.
216. Vallianou NG, Evangelopoulos A, Kazazis C. Metformin and cancer. *Rev Diabet Stud RDS*. 2013;10(4):228–35.
217. Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death. *Curr Top Dev Biol*. 2015;114:67–91.
218. Chalitchagorn K, Shuangshoti S, Hourpai N, Kongruttanachok N, Tangkijvanich P, Thong-ngam D, et al. Distinctive pattern of LINE-1 methylation level in normal tissues and the association with carcinogenesis. *Oncogene*. 2004 Oct 11;23(54):8841–6.
219. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Publ Online 05 August 2002 Doi101038sjonc1205699 [Internet]*. 2002 Aug 5 [cited 2017 Sep 26];21(35). Available from: <https://www.nature.com/ncj/journal/v21/n35/full/1205699a.html>

220. Li N, Chen Q, Gu J, Li S, Zhao G, Wang W, et al. Synergistic inhibitory effects of deferasirox in combination with decitabine on leukemia cell lines SKM-1, THP-1, and K-562. *Oncotarget*. 2017 Mar 27;8.
221. Stresemann C, Lyko F. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):8–13.
222. Borges S, Döppler HR, Storz P. A combination treatment with DNA methyltransferase inhibitors and suramin decreases invasiveness of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Feb;144(1):79–91.
223. Li N, Chen Q, Gu J, Li S, Zhao G, Wang W, et al. Synergistic inhibitory effects of deferasirox in combination with decitabine on leukemia cell lines SKM-1, THP-1, and K-562. *Oncotarget*. 2017 Mar 27;8.
224. Effects of DNA methyltransferase inhibitors (DNMTIs) on MDS-derived cell lines [Internet]. [cited 2017 Sep 26]. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X12004377>
225. Valdez BC, Li Y, Murray D, Corn P, Champlin RE, Andersson BS. 5-Aza-2'-deoxycytidine sensitizes busulfan-resistant myeloid leukemia cells by regulating expression of genes involved in cell cycle checkpoint and apoptosis. *Leuk Res*. 2010 Mar;34(3):364–72.
226. Abe T, Toyota M, Suzuki H, Murai M, Akino K, Ueno M, et al. Upregulation of BNIP3 by 5-aza-2'-deoxycytidine sensitizes pancreatic cancer cells to hypoxia-mediated cell death. *J Gastroenterol*. 2005 May;40(5):504–10.
227. Okami J, Simeone DM, Logsdon CD. Silencing of the Hypoxia-Inducible Cell Death Protein BNIP3 in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5338–46.
228. Zhang Y, Liao Z, Zhang L, Xiao H. The utility of chloroquine in cancer therapy. *Curr Med Res Opin*. 2015 May;31(5):1009–13.
229. Qiu L, Yao M, Gao M, Zhao Q. Doxorubicin and chloroquine coencapsulated liposomes: preparation and improved cytotoxicity on human breast cancer cells. *J Liposome Res*. 2012 Sep;22(3):245–53.
230. Park D, Lee Y. Biphasic activity of chloroquine in human colorectal cancer cells. *Dev Reprod*. 2014 Dec;18(4):225–31.
231. Lee SW, Kim H-K, Lee N-H, Yi H-Y, Kim H-S, Hong SH, et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett*. 2015 May 1;360(2):195–204.
232. Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorg Med Chem*. 2006 May 1;14(9):3218–22.
233. Choi J-H, Yoon JS, Won Y-W, Park B-B, Lee YY. Chloroquine enhances the chemotherapeutic activity of 5-fluorouracil in a colon cancer cell line via cell cycle alteration. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2012 Jul;120(7):597–604.
234. Zheng Y, Zhao Y-L, Deng X, Yang S, Mao Y, Li Z, et al. Chloroquine inhibits colon cancer cell growth in vitro and tumor growth in vivo via induction of apoptosis. *Cancer Invest*. 2009 Mar;27(3):286–92.
235. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. *J Clin Invest*. 2014 Jan;124(1):30–9.
236. Anne M, Sammartino D, Barginear MF, Budman D. Profile of panobinostat and its potential for treatment in solid tumors: an update. *OncoTargets Ther*. 2013;6:1613–24.
237. Ma N, Luo Y, Wang Y, Liao C, Ye W-C, Jiang S. Selective Histone Deacetylase Inhibitors with Anticancer Activity. *Curr Top Med Chem*. 2016;16(4):415–26.
238. Rao R, Balusu R, Fiskus W, Mudunuru U, Venkannagari S, Chauhan L, et al. Combination of pan-histone deacetylase inhibitor and autophagy inhibitor exerts superior efficacy against triple-negative human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2012 Apr;11(4):973–83.
239. Diyabalanage HVK, Granda ML, Hooker JM. Combination therapy: histone deacetylase inhibitors and platinum-based chemotherapeutics for cancer. *Cancer Lett*. 2013 Feb 1;329(1):1–8.



240. Gueugnon F, Cartron P-F, Charrier C, Bertrand P, Fonteneau J-F, Gregoire M, et al. New histone deacetylase inhibitors improve cisplatin antitumor properties against thoracic cancer cells. *Oncotarget*. 2014 Jun 30;5(12):4504–15.
241. Kiliccioglu I, Konac E, Varol N, Gurocak S, Yucel Bilen C. Apoptotic effects of proteasome and histone deacetylase inhibitors in prostate cancer cell lines. *Genet Mol Res GMR*. 2014 May 9;13(2):3721–31.
242. Hutt DM, Roth DM, Vignaud H, Cullin C, Bouche-careilh M. The Histone Deacetylase Inhibitor, Vorinostat, Represses Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha Expression through Translational Inhibition. *PLOS ONE*. 2014 Aug 28;9(8):e106224.
243. Fischer C, Leithner K, Wohlkoenig C, Quehenberger F, Bertsch A, Olschewski A, et al. Panobinostat reduces hypoxia-induced cisplatin resistance of non-small cell lung carcinoma cells via HIF-1 $\alpha$  destabilization. *Mol Cancer*. 2015 Jan 21;14:4.
244. Oh M, Choi I-K, Kwon HJ. Inhibition of histone deacetylase1 induces autophagy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 May 16;369(4):1179–83.
245. Campbell GR, Bruckman RS, Chu Y-L, Spector SA. Autophagy induction by histone deacetylase inhibitors inhibits HIV type 1. *J Biol Chem*. 2015 Feb 20;290(8):5028–40.
246. Di Fazio P, Waldegger P, Jabari S, Lingelbach S, Montalbano R, Ocker M, et al. Autophagy-related cell death by pan-histone deacetylase inhibition in liver cancer. *Oncotarget*. 2016 Apr 5;7(20):28998–9010.
247. Gandesiri M, Chakilam S, Ivanovska J, Benderska N, Ocker M, Di Fazio P, et al. DAPK plays an important role in panobinostat-induced autophagy and commits cells to apoptosis under autophagy deficient conditions. *Apoptosis Int J Program Cell Death*. 2012 Dec;17(12):1300–15.
248. Pullarkat V, Meng Z, Donohue C, Yamamoto VN, Tomassetti S, Bhatia R, et al. Iron chelators induce autophagic cell death in multiple myeloma cells. *Leuk Res*. 2014 Aug;38(8):988–96.
249. Kampan NC, Madondo MT, McNally OM, Quinn M, Plebanski M. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Res Int*. 2015;2015:413076.
250. Peng X, Gong F, Chen Y, Jiang Y, Liu J, Yu M, et al. Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1- $\alpha$ -mediated signaling. *Cell Death Dis*. 2014 Aug 14;5:e1367.
251. Rosati G, Riccardi F, Tucci A, De Rosa P, Pacilio G. A phase II study of paclitaxel/cisplatin combination in patients with metastatic breast cancer refractory to anthracycline-based chemotherapy. *Tumori*. 2000 Jun;86(3):207–10.
252. Hasegawa T, Futamura Y, Horiba A, Yoshida T, Suzuki T, Kato T, et al. A phase II study of nab-paclitaxel plus carboplatin in combination with thoracic radiation in patients with locally advanced non-small-cell lung cancer. *J Radiat Res (Tokyo)*. 2016 Jan;57(1):50–4.
253. Li Y, Zeng Y, Mooney SM, Yin B, Mizokami A, Namiki M, et al. Resistance to paclitaxel increases the sensitivity to other microenvironmental stresses in prostate cancer cells. *J Cell Biochem*. 2011 Aug;112(8):2125–37.
254. Ibrado AM, Liu L, Bhalla K. Bcl-xL Overexpression Inhibits Progression of Molecular Events Leading to Paclitaxel-induced Apoptosis of Human Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. *Cancer Res*. 1997 Mar 15;57(6):1109–15.
255. Wang Q, Wang N, Shao G, Qian J, Shen D, Fei Y, et al. Relationship between gastric cancer tau protein expression and paclitaxel sensitivity. *Pathol Oncol Res POR*. 2013 Jul;19(3):429–35.
256. Liang C, Li L, Fraser CD, Ko A, Corzo D, Enger C, et al. The treatment patterns, efficacy, and safety of nab<sup>®</sup>-paclitaxel for the treatment of metastatic breast cancer in the United States: results from health insurance claims analysis. *BMC Cancer*. 2015 Dec 29;15:1019.
257. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2014 Sep 15;25(18):2677–81.
258. Li R, Moudgil T, Ross HJ, Hu H-M. Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim. *Cell Death Differ*. 2005 Mar;12(3):292–303.

259. Brodie C, Siriwardana G, Lucas J, Schleicher R, Terada N, Szepesi A, et al. Neuroblastoma Sensitivity to Growth Inhibition by Deferrioxamine: Evidence for a Block in G1 Phase of the Cell Cycle. *Cancer Res.* 1993 Sep 1;53(17):3968–75.
260. Veldhoen RA, Banman SL, Hemmerling DR, Odsen R, Simmen T, Simmonds AJ, et al. The chemotherapeutic agent paclitaxel inhibits autophagy through two distinct mechanisms that regulate apoptosis. *Oncogene.* 2013 Feb 7;32(6):736–46.