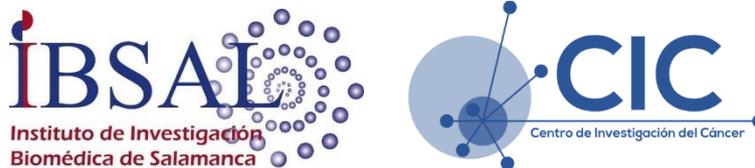




**VNiVERSIDAD  
D SALAMANCA**

CAMPUS OF INTERNATIONAL EXCELLENCE



**PROGRAMA DE DOCTORADO BIOCENCIAS: BIOLOGÍA Y  
CLÍNICA DEL CÁNCER Y MEDICINA TRASLACIONAL**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO  
SINÉRGICO ENTRE RADIOTERAPIA Y  
MODULADORES DE LA AUTOFAGIA**

**ELÍSBET GONZÁLEZ DEL PORTILLO**

Salamanca – Abril 2021



## Directores

**Dr. Rogelio González Sarmiento**

Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca  
Director científico del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)

**Dr. Luis Alberto Pérez Romasanta**

Jefe de Servicio y Profesor Asociado de Oncología Radioterápica del Hospital  
Universitario de Salamanca

## Tutor

**Dr. Rogelio González Sarmiento**

Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca  
Director científico del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL)



El Dr. Rogelio González Sarmiento, Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca, y el Dr. Luis Alberto Pérez Romasanta, Jefe de Servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Salamanca,

Certifican que el trabajo de investigación titulado ‘EVALUACIÓN DEL EFECTO SINÉRGICO ENTRE RADIOTERAPIA Y MODULADORES DE LA AUTOFAGIA’ ha sido realizado por Elísabet González Del Portillo, en el Departamento de Medicina, bajo su dirección y asesoramiento técnico y científico, y que una vez revisado lo consideran apto para ser presentado ante el tribunal evaluador correspondiente y optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Salamanca a 9 de marzo de 2021.

Fdo. Dr. Rogelio González Sarmiento

Fdo. Dr. Luis A. Pérez Romasanta



A mis padres, Ana y Jesús, y a mi hermano, David.

A mis amigos, la familia que he elegido.

A todos y cada uno de los que han creído en mí.



## ***AGRADECIMIENTOS***

Es difícil expresar solo con palabras mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible llevar a término este trabajo.

En primer lugar y porque gracias a él me embarqué en este proyecto, quiero agradecer al Dr. Pablo Miramontes ser mi guía en los primeros pasos como residente de primer año recién llegada al hospital, enseñarme mucha medicina interna y mostrarme el mundo de la investigación, proyectos, publicaciones y, por supuesto, el camino de la tesis.

Él fue quien me presentó a uno de los grandes pilares de esta tesis, el Dr. Rogelio González. Me siento muy afortunada de tener un tutor y un director de tesis como él, no solo por su extensa experiencia y rigor metodológico, sino por su disponibilidad, consejo, dedicación y entrega durante el desarrollo de esta tesis y, muy especialmente, en los momentos en los que las cosas no salían a la primera.

Otro gran pilar de este proyecto es el Dr. Luis A. Pérez Romasanta, también director de esta tesis. Gracias por su guía y su consejo a lo largo de este proyecto. Durante estos años me ha inculcado que ‘el tiempo es elástico’ y que es posible, con tesón y esfuerzo, alcanzar tus objetivos. Se puede conseguir todo aquello que nos propongamos, a pesar de las dificultades.

Por supuesto, mencionar a todo el equipo de la Unidad de Medicina Molecular de la Facultad de Medicina y del Laboratorio 14 del Centro de Investigación del Cáncer. Han estado ahí en cada paso y en cada tropiezo. Por orden alfabético: Abel, Ana, Carlos, Diego, Eva, Jessi, María, Marian, Nerea, Nieves, Nuria, Pamela, Pablo, Paula, Ricardo, Sonia, y todos aquellos con los que he compartido momentos en estas cuatro paredes y de los que tanto he aprendido. Gracias por ayudarme desde el primer momento que entré en el laboratorio, por enseñarme que todo empieza con una pipeta y una placa, la importancia de que la investigación, con todos sus resultados, positivos y negativos, es fundamental para poder ofrecer lo mejor a nuestros pacientes. De todos ellos, quiero hacer una mención especial a María. Gracias por tu apoyo incondicional y motivación, por tu paciencia explicándome una y mil veces cada paso, por contestar mis mensajes cualquier día y a cualquier hora, por estar conmigo en el campo de batalla y seguir ahí cuando me faltaba tiempo y fuerzas para seguir. Gracias por haber sido además de compañeros, amigos.

Agradecer al Dr. Javier Borrajo su accesibilidad y disponibilidad para utilizar el equipo de irradiación, su experiencia y su consejo.

No me puedo olvidar a todos aquellos que, desde el hospital, han participado de una u otra forma en este proyecto. En primer lugar, a los médicos adjuntos de mi servicio, Oncología Radioterápica del Hospital Universitario de Salamanca, por orden alfabético: Dra. Orlanda Alonso, Dra. Cristina Cigarral, Dra. Catalina Gil, Dra. Mar González, Dra. Ángela Matías, Dra. Adela Nieto, Dra. Ana Rodríguez y Dr. Pedro Soria. Y ahora también a mis dos residentes pequeños que, para mí, siempre serán los pequeños: Dra. Gemma Alberca y Dr. Manuel E. Luna. Me han enseñado, junto a muchos otros en mi época de estudiante, a amar mi profesión, ser médico, y a disfrutar de mi especialidad como un niño con su juguete preferido. Todo lo que hacemos es para y por nuestros pacientes. Son el motor de nuestro trabajo y de los que sacamos la fuerza para luchar cada día. Agradeceros a todos vuestro apoyo, paciencia, cariño y comprensión, cada día de mi residencia, no solo dentro de la consulta, también fuera de ella. Sin vosotros, no hubiera sido posible. Gracias por enseñarme tanto.

Fuera de mi servicio y de mi hospital, son muchos los médicos adjuntos y residentes, así como otros profesionales de servicios por los que he rotado, los que también me han apoyado. Agradecer expresamente a los que también considero mis adjuntos, los radiofísicos, y al equipo de enfermería, auxiliares y técnicos de radioterapia, del Hospital Universitario de Salamanca. No puedo olvidarme de los que he conocido en el Hospital Universitario de Valdecilla, Hospital Clínico de Valladolid, Hospital Ruber Internacional de Madrid, Hospital Universitario Vall D'Hebron y Laboratorios de Investigación de la UCT Científico Tecnológica del IBS Granada (Hospital Universitario San Cecilio de Granada).

No hubiera sido posible recorrer este camino sin mi familia. Soy consciente de lo afortunada que soy por tenerla. En cada aventura de mi vida, grande o pequeña, ha sido mi gran apoyo, incondicional y sin límites. Han vivido 'la tesis' y todo lo que ello implica en primera persona. Han escuchado con paciencia cada revés del viaje y han celebrado cada logro, por pequeño que fuera. Han entendido mis ausencias y han venido sin dudarlo para darme ese abrazo que tanto he necesitado en algunos momentos. A mis padres, nunca

podré agradeceros todo lo que habéis hecho, hacéis y haréis por vuestros hijos. Gracias por poner a nuestro alcance todas las oportunidades, por ayudarnos a perseguir nuestros sueños, acompañarnos en el camino y sostenernos cuando es preciso. Gracias a mi hermano, David, por tu ejemplo de lucha y superación para conseguir aquello que amas, por enseñarme que el trabajo de tus sueños no es un trabajo, sino un regalo.

A Diego, gracias por ser como eres, por tu paciencia infinita, por estar ahí siempre, por levantarme, pero también a abrazarme en la caída, por no dudar de que podía conseguirlo. Gracias por apoyarme, sostenerme y creer en mí.

Gracias a mis amigos, la familia que he escogido. Sin ellos no habría sido posible. Todos han vivido, en algún momento ‘sufrido’, mis idas y venidas con ‘mis celulitas’ en cada cena, en cada viaje. Todos han lidiado con mi desesperación cuando algo no salía a la primera, ni a la segunda, ni a la tercera... Todos, y por eso sé lo afortunada que soy, siempre me han animado para continuar este viaje. Gracias a Rubén, Jose, Carlos, Rosa, Vero, Noelia... y todos los que me dejo.

En el último párrafo quiero recordar a los que ya no están, porque desde un lugar diferente me han dado fuerzas y guiado cuando todo se volvía oscuro para seguir peleando por un proyecto que me ha ilusionado como pocos.

Gracias, porque entre todos habéis hecho posible que este proyecto llegue a buen puerto. Gracias por enseñarme a disfrutar de mi trabajo.

Salamanca, 8 de Marzo de 2021



## *ABREVIATURAS*

$\alpha/\beta$ : ratio alfa/beta  
5-FU: 5-Fluorouracilo  
A: adenina  
Ää: aminoácidos  
ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADN-PKcs: subunidad catalítica de quinasas dependiente de ADN  
Akt: Protein Kinase B  
AMPK: proteína quinasa monofosfato-activado  
AMPS: persulfato de amonio  
APE: AP endonucleasas  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ATCC: American Type Culture Collection  
ATG: gen relacionado con la autofagia  
ATM: proteína mutada ataxia-telangiectasia  
ATP: Adenosina Trifosfato  
ATR: proteína AT-relacionada ataxia-telangiectasia y Rad3-related  
BAX: Bcl-2-Associated X protein  
BCL-2: B-Cell CLL/Lymphoma 2  
Bcl-XL: señal antiapoptótica  
BECN1: Beclin1  
BED: dosis biológica efectiva o equivalente  
BER: reparación de escisión de bases (base excision repair)  
BH3: proteínas BCL-2-homólogas 3  
Bim: molécula proapoptótica  
BRCA1: gen del cáncer de mama 1  
BRCA2: gen del cáncer de mama 2  
BSA: Bovine Serum Albumin  
C: citosina  
CAMs: cadherinas  
CDK: quinasas dependientes de ciclinas  
ICDK: inhibidores de las CDK  
CDKN1A: inhibidor de las CDK 1A  
CDKN2A: inhibidor de las CDK 2A

CDs: células dendríticas  
CH3: grupo metilo  
CH3CO: grupo acetilo  
CI: índice de combinación  
CMH: complejo mayor de histocompatibilidad  
CNK: células *natural killer*  
CPAs: células presentadoras de antígeno  
CQ: cloroquina  
CTCL: linfoma cutáneo de célula T  
CTL: linfocitos T citotóxicos  
DAMPs: damage associated molecular patterns  
DAPK: proteína kinasa asociada a muerte  
DDR: respuesta al daño de ADN  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
DMSO: dimetilsulfoxido  
RCD: rotura de doble cadenas  
RRCS: reparación rotura de doble cadenas  
E: efecto  
E2F: factor de transcripción E2F  
EDTA: ácido etilen diamino tetra acético  
eIF2a: factor de iniciación eucariota 2 $\alpha$   
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico  
ERK: *Extracellular-signal-regulated kinase*  
FAS: receptor de superficie  
FBS: Suero fetal bovino  
FDA: *Food and Drug Administration*  
FEN1: endonucleasa Flap 1  
FGF1/2: factores de crecimiento fibroblásticos  
FOXO: *Forkhead box protein O1*  
G: guanina  
GRP78: proteína glucosa-relacionada 78  
GTPasa: guanosina trifosfato  
Gy: grey  
HATs: histonas acetiltransferasas

HDAC: histonas deacetilasas  
HDACi: inhibidores de HDAC  
HDR: braquiterapia de alta tasa  
HER2: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano  
HRP: enzima peroxidasa de rábano  
HSC70: chaperona 70  
HSPA8: chaperona 8  
ICD: *immunogenic cell death*, muerte celular inmuogénica  
ICL: interstrand cross link  
INE: Instituto Nacional de Estadística  
IORT: *intraoperative radiotherapy*, radioterapia intraoperatoria  
IRE1a: *Inositol-Requiring Enzyme 1*  
JNK: JUN N-terminal Kinase  
LAMP2: Lysosomal-Associated Membrane Protein 2  
LB: linfoma de Burkitt  
LBH589: Panabinoestat®  
LAMP3: proteína de membrana asociada al lisosoma 3  
LC3 (MAP1LC3): Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3  
LDR: braquiterapia de baja tasa  
LET: *linear energy transfer*, transferencia lineal de energía  
LH: linfoma Hodgkin  
LIG1: ligasa 1  
LIG3: ligasa 3  
LLA: leucemia linfoblástica aguda  
LT: linfoma célula T  
LQ: modelo lineal-cuadrático  
MAP1LC3: microtubule-associated protein 1 light chain 3β  
MAPK: proteína quinasa mitogen-activado  
MCA: muerte celular accidental  
MCP: muerte celular programada  
MDSCs: células mieloides supresoras  
MLKL: *lineage kinase domain-like pseudokinase*, dominio de quinasa de linaje mixto  
MM: mieloma múltiple  
MMPs: metaloproteinasas

MMR: mismatch repair  
MOMP: poro de la membrana mitocondrial  
mTOR: complejo sensible a rapamicina  
NaCl: cloruro sódico  
NAD: *nicotinamide adenine dinucleotide*  
NER: *nucleotide excision repair*, reparación por escisión de nucleótidos  
NF-κB: *Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells*  
NHEJ: *non-homologous end joining*, recombinación no homóloga  
OSR: órganos sanos adyacentes  
OIS: *oncogene-induced senescence*, senescencia inducida por oncogen  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
p21: gen humano localizado en el cromosoma 6  
p27<sup>Kip1</sup>: inhibidor de CDK2  
p62: proteína del gen SQSTM1  
PAR: enzimas poli-(ADP-ribosylation)  
PARG: poli (ADPribosa)-glicohidrosilasas  
PARP: enzimas poly (ADP-ribosylation)-polymerase  
PBS: tampón fosfato salino  
PE: *phosphatidylethanolamide*  
PERK: proteína quinasa del retículo endoplasmático  
PI(3)P (PIP3): fosfatidilinositol 3-fosfato  
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa  
PIK3C3 (VPS34): fosfatidilinositol 3-quinasa, subunidad catalítica tipo 3  
PIK3R1/2/4: fosfatidilinositol 3-quinasa, subunidad reguladora 1/2/4  
PNK: quinasa polinucleótida  
PNKP: quinasa polinucleótida 3'-fosfatasa  
POLβ: polimerasa β  
PSA: antígeno prostático específico  
PTCL: linfoma periférico de célula T  
*PTEN: tensin homolog*  
PTV: *planning tumour volume*, volumen tumoral planificado  
r.p.m.: Revoluciones por minuto  
R: punto de restricción  
Ras: Rat Sarcoma

RB1: Retinoblastoma 1  
Rb o pRb: proteína del retinoblastoma  
RCD: *regulated cell death*, muerte celular programada  
RE: retículo endoplasmático  
RH: recombinación homóloga  
RIPK1: receptor de interacción de quinasa 1  
RIPK3: receptor de interacción de quinasa 1  
RNS: *reactive nitrogen species*, especies reactivas de nitrógeno  
ROS: *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno  
RT: radioterapia  
SAHA: ácido hidroxámico vorinostat®  
SBRT: *stereotactic body radiation therapy*, radioterapia estereotáctica fraccionada  
SC: señales de crecimiento  
SCFAs: ácidos grasos de cadena corta  
SIRT: sirtuina  
SIRTs: sirtuinas  
SNARE: receptor SNAP  
SQSTM1 (p62): Sequestosoma 1  
SRS: *stereotactic radiosurgery*, radiocirugía estereotáctica  
RCS: rotura de cadenas simple  
RRCS: reparación rotura de cadenas simple  
T: timina  
TBS-T: Tween-20 en TBS  
TEMED: tetrametiletilendiamina  
TIE2: quinasa endotelial túnica íntima 2  
TLR 4: receptor Toll-like 4  
TNF: factor de necrosis tumoral  
TNFR: receptor factor de necrosis tumoral  
TNM: sistema clasificación tumores malignos  
TP53 o p53: proteína tumoral 53  
Tregs: linfocitos T reguladores  
Triton x-100  
TrypLE: tripsina  
TSA: tricostatina A

UBA: dominio asociado a ubiquitinina

ULK: Ulk1/2 quinasa ½ tipo unc-51

UPR: *unfolded protein response*, respuesta a proteínas mal plegadas

UV: Ultravioleta

UVRAG: gen asociado a resistencia frente a irradiación ultravioleta

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

VEGF-A: factor de crecimiento endotelial vascular A

VPH: virus papiloma humano

WIPI1/2: dominio WD, fosfoinositida 1/2



# ÍNDICE

1. Introducción
  - 1.1. ¿Qué es el cáncer y cómo se produce?
  - 1.2. Epidemiología del cáncer
  - 1.3. Tipos de muerte celular
    - 1.3.1. Apoptosis
    - 1.3.2. Necrosis
    - 1.3.3. Necroptosis
  - 1.4. Senescencia
  - 1.5. Autofagia
    - 1.5.1. Autofagia y cáncer
  - 1.6. Tratamiento. Diferentes armas terapéuticas
    - 1.6.1. Radioterapia
      - 1.6.1.1. Generalidades
      - 1.6.1.2. Efecto biológico de la radioterapia
      - 1.6.1.3. Daño en el ADN
      - 1.6.1.4. Radiosensibilidad y las '5 R' de radioterapia
      - 1.6.1.5. Dosis biológica efectiva o equivalente (BED). Modelo lineal cuadrático. Ratio alfa/beta
      - 1.6.1.6. Muerte celular por radioterapia
      - 1.6.1.7. Relación entre autofagia y radiaciones ionizantes
    - 1.6.2. Agentes quimioterápicos
      - 1.6.2.1. Proteínas HDAC como posibles dianas terapéuticas y Panobinostat®
        - 1.6.2.1.1. Epigenética
        - 1.6.2.1.2. Acetilación de las histonas
        - 1.6.2.1.3. Inhibidores HDAC (HDACi)
        - 1.6.2.1.4. Mecanismo de acción de los HDACi
        - 1.6.2.1.5. Tipos de HDACi
          - 1.6.2.1.5.1. Ácidos hidroxámicos
    - 1.6.3. Cloroquina

2. Hipótesis y objetivos
3. Material y métodos
  - 3.1. Líneas celulares
    - 3.1.1. MDA-MB-231
    - 3.1.2. HCC-1937
    - 3.1.3. VCAP
    - 3.1.4. CAL33
    - 3.1.5. 32860
  - 3.2. Cultivos celulares
  - 3.3. Agentes farmacológicos
  - 3.4. Radioterapia
  - 3.5. Ensayo de apoptosis y cálculo de sinergismo
  - 3.6. Extracción de proteínas
  - 3.7. Western Blot
4. Resultados
  - 4.1. Tratamientos en monoterapia y en combinación de las dos líneas celulares de cáncer de mama
  - 4.2. Tratamientos en monoterapia y en combinación en las líneas celulares de tumores de área de cabeza y cuello
  - 4.3. Tratamientos en monoterapia y en combinación en la línea celular de cáncer de próstata
  - 4.4. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular MDA-MB-231
    - 4.4.1. Estudio de la expresión de p62
    - 4.4.2. Estudio de la expresión de Beclin-1
    - 4.4.3. Estudio de la expresión de LC3 I y II
  - 4.5. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular VCAP
    - 4.5.1. Estudio de la expresión de p62
    - 4.5.2. Estudio de la expresión de Beclin-1
    - 4.5.3. Estudio de la expresión de LC3 I y II

5. Discusión
6. Conclusiones
7. Bibliografía



## *1. INTRODUCCIÓN*

## 1.1.¿QUÉ ES EL CÁNCER Y CÓMO SE PRODUCE?

El cáncer es un conjunto de enfermedades que se caracterizan por una proliferación descontrolada de las células que puede provocar graves alteraciones en la forma y función de los tejidos y órganos afectados.

Su origen se debe a múltiples alteraciones genéticas, como mutaciones en genes supresores de tumores, oncogenes y anormalidades cromosómicas, y epigenéticas, que desregulan la expresión génica y conducen a la adquisición de fenotipos tumorales. Estos fenotipos presentan un potencial replicativo ilimitado, una mayor cantidad de señales de proliferación, una capacidad para evadir la apoptosis, invadir y metastatizar, e inducir angiogénesis (1–3).

Hanahan y Weinberg (2000) publicaron un modelo con los mecanismos moleculares que definen las células tumorales y que permiten esa proliferación anormal ‘crónica’ que da lugar a masas macroscópicas a nivel local y metástasis a distancia (Figura 1) (3,4):

- **Auto-suficiencia en señales de crecimiento.** Las células tumorales generan sus propias señales de crecimiento (SC), reduciendo así la dependencia del microambiente celular normal.
- **Insensibilidad a inhibidores del crecimiento.** La evasión de los mecanismos de control del crecimiento facilita la proliferación descontrolada de las células tumorales. Se ha observado la inactivación de genes supresores de tumores como el retinoblastoma (*RB*) y el *TP53*.
- **Capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis.** Implica una serie de procesos que comienza con la invasión local, la entrada a los vasos sanguíneos y linfáticos por parte de las células tumorales, la circulación de las mismas por el sistema hematológico y linfático, la extravasación de dichas células a los tejidos adyacentes o a los vasos más o menos lejanos al punto de origen, la formación de micrometastásis y, finalmente, la aparición de macrometastásis. Para ello, participan proteasas, cadherinas (CAMs) e integrinas.
- **Potencial replicativo ilimitado.** A diferencia del resto de células, las tumorales son capaces replicarse de forma descontrolada hasta generar tumores macroscópicamente visibles. Esta capacidad se ha atribuido al hecho de mantener

el ADN telomérico con una longitud suficiente como para evitar la senescencia y la apoptosis.

- **Angiogénesis.** Las células tumorales son capaces de inducir el proceso de angiogénesis y mantenerlo, para conseguir así el aporte de nutrientes y oxígeno necesario para su crecimiento, tanto en etapas tempranas como tardías del proceso tumoral. Además, la angiogénesis facilita la invasión locorregional y a distancia, produciendo metástasis.
- **Evasión de la apoptosis.** Las células tumorales tienen la capacidad de evadir este tipo de muerte celular, proliferando de manera descontrolada mediante diversas estrategias: a) pérdida de la función supresora de *TP53*, b) aumento de la expresión de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) o de las señales de supervivencia (Igl1/2), y c) disminución de los factores proapoptóticos (Bax, Bim, Bume).

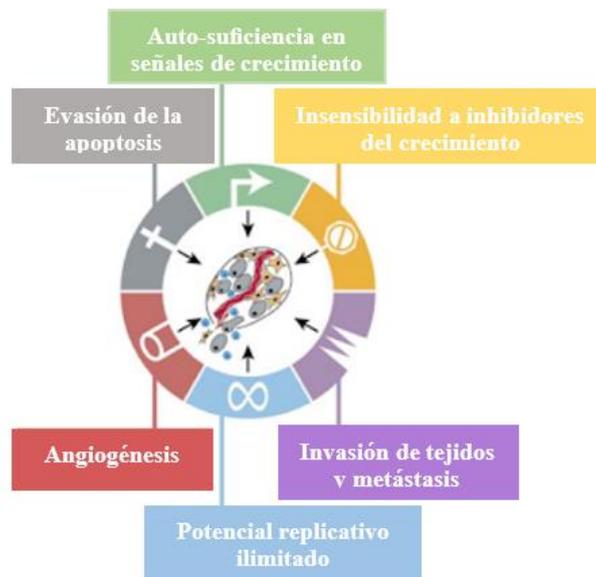


Figura 1. Figura modificada del artículo de Hanahan y Weinberg (1).

Once años más tarde, estos mismos autores, Hanahan y Weinberg, actualizaron este modelo teniendo en cuenta lo publicado en la última década (4,5) e incluyeron otros mecanismos que se describen a continuación y se recogen en la Figura 2:

- **Evasión del sistema inmune.** Las células tumorales presentan alteraciones que las hacen ser detectadas por el propio sistema inmune para su eliminación. Para evitarlo son capaces de inactivar diversos componentes de dicho sistema.
- **Inflamación.** Las células inflamatorias pueden llegar a suponer el 80% de la masa tumoral y participan en la progresión tumoral mediante señales que facilitan el

crecimiento ilimitado, generación de nuevos vasos, supervivencia celular, etc..., especialmente en estadios iniciales de la enfermedad. Por otro lado, las células inflamatorias producen sustancias, como especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* - ROS), que favorecen los cambios en las células vecinas.

- **Mutaciones e inestabilidad genómicas.** Estas mutaciones implican defectos en genes involucrados en detectar el daño presente en el ADN y activar su reparación, reparar el ADN dañado e inactivar agentes que van a producir un daño en el ADN. Todo ello concede a las células tumorales ciertas ventajas sobre la reparación y mantenimiento de los defectos en el genoma, favoreciendo su supervivencia celular y, por tanto, la progresión tumoral.
- **Alteraciones del metabolismo energético tumoral.** Las células tumorales reprograman el metabolismo de la glucosa y producen energía principalmente a través de la glucólisis anaerobia incluso en condiciones de abundancia de oxígeno ('glucólisis aeróbica' o efecto *Warburg*) que les permite crecer rápidamente y proliferar de forma continua. Se ha visto que algunos tumores contienen dos subpoblaciones celulares: unas son células dependientes de glucosa que secretan lactato, mientras que las células de la otra subpoblación utilizan ese lactato. Es decir, tienen una relación de simbiosis: las células tumorales hipóxicas utilizan la glucosa como combustible y a cambio producen lactato que es utilizado por otras células tumorales vecinas mejor oxigenadas.

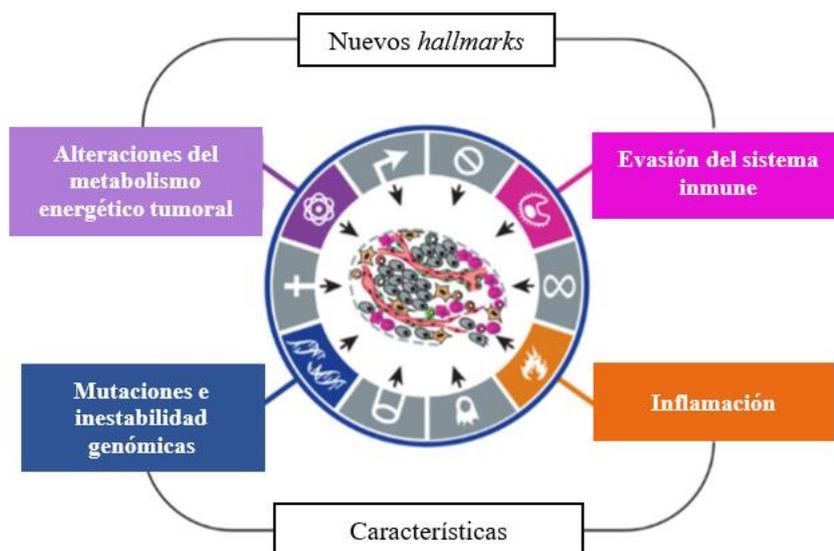


Figura 2. Figura modificada del artículo de Hanahan y Weinberg (5).

Los autores de esta revisión, así como otros trabajos, enfatizan en la selección de agentes terapéuticos que interfieran en cualquiera de estos 10 *hallmarks* distintivos del cáncer reconocidos en la actualidad, con el fin de frenar el crecimiento neoplásico y reducir toxicidad no-específica (Figura 3) (5). Hay que tener en cuenta que, dado que en cada *hallmark* intervienen múltiples vías, un agente terapéutico puede no inhibirlo por completo, de modo que algunas células pueden sobrevivir y adaptarse a las nuevas condiciones. Si se consiguiera interferir en varias vías de un mismo *hallmark*, se podría llegar a inhibir por completo.

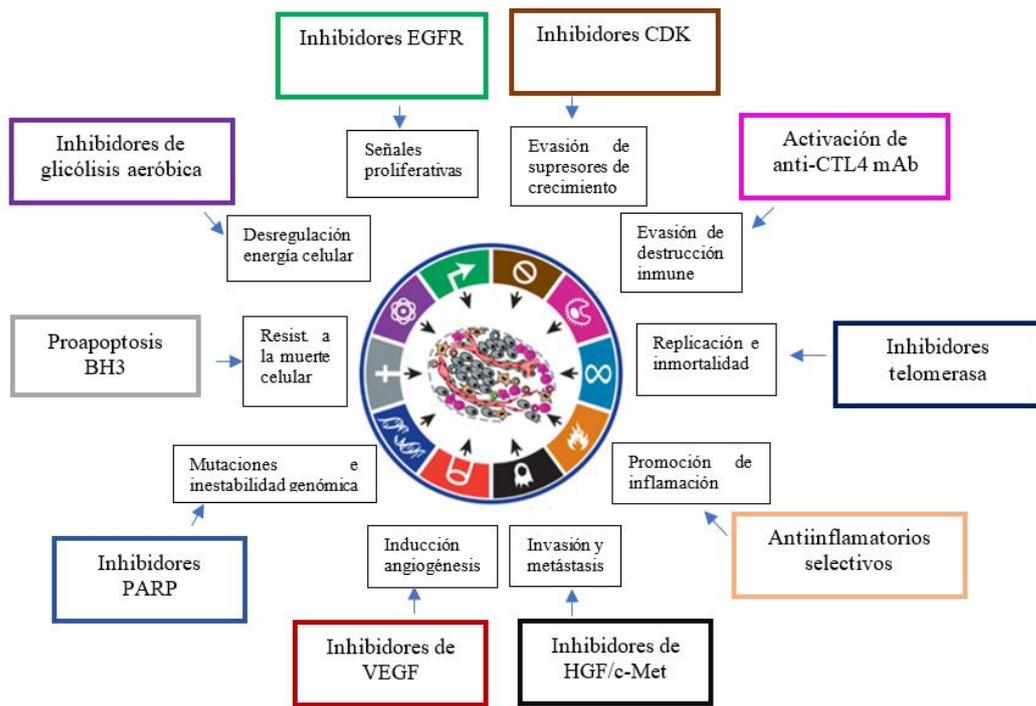


Figura 3. Figura modificada del artículo de Hanahan y Weinberg (5).

Revisiones posteriores han valorado y apoyado también el papel de los *hallmarks* en el desarrollo del cáncer. Estos puntos nos ayudan a entender los mecanismos empleados por las células tumorales y desarrollar posibles tratamientos. No obstante, hay que tener en cuenta que el cáncer no es una enfermedad única y que intervienen múltiples vías en su desarrollo.

Otro posible punto de actuación es la prevención en la aparición de esas células tumorales. Para ello, se deben establecer los *hallmarks* de las células sanas, el envejecimiento, su relación con los de las células tumorales y cómo se puede romper dicha relación (4).

## 1.2.EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer constituye una de las principales causas de morbi-mortalidad en todo el mundo. Según los últimos datos publicados, se estima aproximadamente 18 millones de casos nuevos en el año 2018 globalmente (6,7). La previsión es un aumento progresivo de esta cifra hasta casi alcanzar los 30 millones en 2040 (6).

En España, el cáncer también supone una de las principales causas de morbi-mortalidad. Según las cifras del Instituto Nacional de Estadística publicadas en diciembre de 2019, los tumores constituyeron la segunda causa de muerte en España (26,4% de los fallecimientos) por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio en el 2018. Las estimaciones de casos diagnosticados en el 2020 prevén alcanzar los 277.394 casos (169.348 en  $\geq 65$  años, 108.046 en  $< 65$  años) según los cálculos de REDECAN, una cifra muy similar a la del año 2019 (6,8). Por orden de frecuencia, los cánceres más diagnosticados en este año serán de colon y recto (44.231 nuevos casos), próstata (35.126), mama (32.953), pulmón (29.638) y vejiga urinaria (22.350). Hay que tener en cuenta que el aumento en las cifras absolutas de los cánceres diagnosticados en España en las últimas décadas se puede relacionar con un aumento del envejecimiento de la población, mayor exposición a factores de riesgo y mejora en las técnicas de detección.

Al mismo tiempo, también se ha registrado un aumento en la supervivencia en los últimos años, lo cual puede estar debido a varios motivos: 1) mejora en programas de detección, permitiendo diagnósticos en estadios más precoces, y 2) mejora de las diferentes armas terapéuticas. Por otro lado, se han identificado múltiples factores de riesgo, como el tabaco, el alcohol, la obesidad, los malos hábitos dietéticos o la falta de actividad física, como responsables de hasta 2/3 de los casos de cáncer, incluidos los más comunes (cáncer de pulmón, colorrectal, próstata, mama) (9–12). Según los últimos datos, la reducción en el consumo de tabaco en población masculina durante los últimos años se asocia a una tendencia a la baja lenta, pero continua, de la incidencia global de los tumores secundarios a su consumo. En cambio, el aumento de su consumo entre las mujeres desde los años 70 se relaciona con un aumento en los próximos años de los tumores relacionados a dicho factor de riesgo en la población femenina. Este aumento de la supervivencia se ha traducido en un aumento de su prevalencia. En 2018, los tumores más prevalentes en la

sociedad española incluyendo ambos sexos fueron el cáncer de mama, de próstata y colorrectal (6).

Respecto a las líneas celulares analizadas en este trabajo, pertenecen a cáncer de mama, cabeza y cuello, y de próstata. El cáncer de mama es el cáncer más frecuente en la mujer española, con una estimación de nuevos casos en España para 2020 es de 32953 (6,13). A pesar de su alta incidencia, la prevalencia ha aumentado en los últimos años gracias a una mejora en los programas de cribado y en los tratamientos, lo que ha permitido una disminución de la mortalidad. No obstante, el cáncer de mama sigue siendo la primera causa de muerte por cáncer en las mujeres en España; se contabilizaron 6534 mujeres fallecidas por esta causa en 2018 (6).

Por otro lado, el cáncer de área otorrinolaringológica puede surgir en múltiples localizaciones como senos paranasales, nasofaringe, orofaringe (amígdala, paladar blando, base de lengua), hipofaringe, laringe, cavidad oral (mucosa oral, encía, paladar duro, lengua y suelo de boca), lengua y glándulas salivares. Existen varios factores de riesgo y se observan diferencias geográficas influenciados por los mismos. En todo el mundo es el sexto tumor más frecuente. En España, se estimó que para el 2020 hubiera 8604 nuevos casos (6). Al tratarse de un grupo tan amplio, existen diferencias en cuanto a prevalencia y mortalidad según la localización. En total, en España hubo 2410 muertes por estos tumores en 2018 (6).

Por último, el cáncer de próstata es el segundo tumor más frecuente en población masculina en todo el mundo. La extensión del uso del cribado mediante PSA ha permitido detectar este tumor en estadios muy precoces de la enfermedad con el consecuente impacto positivo en la supervivencia. En España, se estimó que en el año 2020 se diagnosticarían 35126 nuevos casos (6). El pronóstico es excelente en estadios localizados y grupos de riesgo bajo y va empeorando a medida aumenta el grupo de riesgo y la enfermedad deja de ser órgano-confinada. De hecho, se trata del tumor más prevalente en población masculina (106.941 (25,8%) en 2018) y con una baja mortalidad (5.841 defunciones por cáncer de próstata en 2018) (6).

### 1.3.TIPOS DE MUERTE CELULAR

Las células siguen un conjunto ordenado de eventos conocidos como ciclo celular con el objetivo de crecer y dividirse (Figura 4). Este ciclo es un proceso altamente regulado que tiene lugar en dos fases principales: la interfase, que incluye G1, S y G2, y la mitosis, que es la división celular propiamente dicha. Durante la fase G1 se produce el crecimiento de los orgánulos y su duplicación; en la fase S se realiza la copia del ADN; y en la fase G2 se reorganiza y se prepara para la división (14,15). El desarrollo adecuado y completo del ciclo y división celulares está controlado por *checkpoints* o puntos de control. Uno de ellos es el punto de restricción (R) en la fase G1. Éste es el más importante, encargado de verificar que las condiciones de la célula son las adecuadas para proseguir en el ciclo celular. Una vez superado el punto R, la mayoría de las células completan el ciclo celular (15,16). Entre las fases G1 y S, y G2 y M hay más puntos de control, como las proteínas retinoblastoma (Rb) y p16 (15–17). En la transición G1/S existe el *checkpoint* G1 que detecta daño en el ADN e impide continuar hasta que no se repare. En la transición G2/M existe otro *checkpoint* que evita la entrada en mitosis si la célula presenta daño en el ADN que no ha sido detectado previamente o ha sufrido un daño después de pasar los controles previos. Si en cualquiera de estos puntos se detecta un daño en el ADN aumenta la producción de la proteína p53 que detiene la progresión del ciclo y da paso a los mecanismos de reparación. En caso de que no sea posible la reparación, la célula entra en muerte celular por apoptosis y no progresa su replicación (15,18).

En estos puntos de control actúan las enzimas denominadas quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que colaboran en la superación de dichos controles. Las quinasas dependientes de ciclinas que intervienen en estos checkpoints son: CDK 1, 2, 4 y 6. Estas quinasas requieren activarse gracias a las ciclinas para cumplir con su función (15,17–19). Las células tumorales, por su parte, presentan mutaciones que les permiten saltarse los controles moleculares y dividirse sin control.

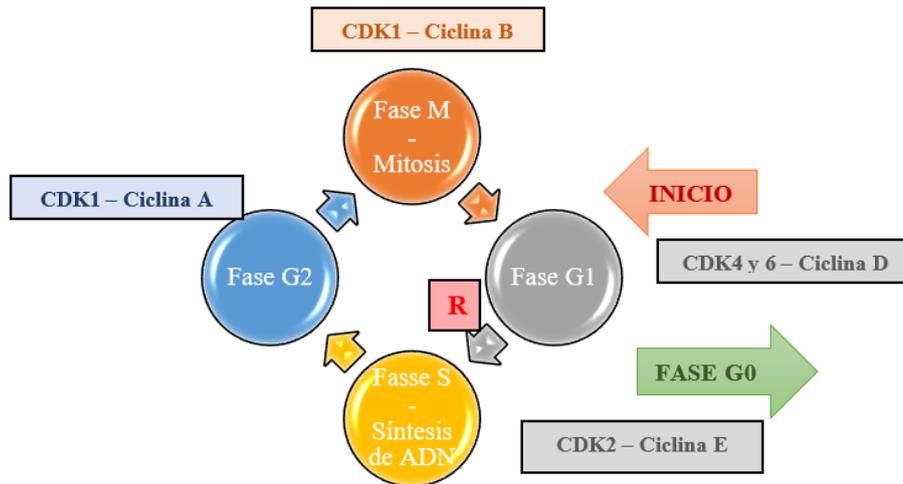


Figura 4. Ciclo celular. Las fases G1, S y G2 constituyen la interfase. A continuación, tiene lugar la mitosis, la división celular propiamente dicha. R: punto de restricción. CDK: quinasas dependientes de ciclinas.

La muerte celular se caracteriza clásicamente por la pérdida de capacidad replicativa. Esta muerte se puede producir por distintos mecanismos en respuesta a distintos tipos de estrés.

En la actualidad, se considera que existen fundamentalmente dos tipos de muerte celular en base a distintos aspectos funcionales: la muerte celular accidental (MCA) y la muerte celular programada (MCP). La MCA es un proceso biológicamente descontrolado que se origina en respuesta a ataques y daños inesperados que colapsan los posibles mecanismos de control, mientras que en la MCP intervienen multitud de cascadas de señalización celular altamente organizadas y mecanismos moleculares efectores, provocando cambios bioquímicos, funcionales e inmunológicos con el fin de realizar la renovación tisular y mantener la homeostasis en situaciones fisiológicas y patológicas (14,20–26). La pérdida del control sobre alguno de los tipos de muerte celular contribuye al desarrollo de enfermedades entre las que se encuentra el cáncer.

### 1.3.1. NECROSIS

La necrosis se considera un tipo de muerte celular no regulada MCA que ocurre tras un agente estresante, ya sea físico, químico o mecánico, que conllevan condiciones extremas del ambiente celular, como cambios en el pH, pérdida de energía, alteraciones iónicas, siendo la radioterapia (RT) uno de esos posibles agentes (14,27–29). Este proceso generalmente implica una regulación al alza de la producción de proteínas y compuestos

proinflamatorios, como NF- $\kappa$ B, que conducen a la rotura de la membrana celular y la liberación del contenido celular. Esta liberación de contenido provoca una respuesta inflamatoria y de daño tisular (20,27,28).

### 1.3.2. APOPTOSIS

La apoptosis es el tipo de muerte celular mejor caracterizado y prevalente dentro del grupo de MCP (27). De manera general, una vez que la célula sufre un daño que desencadena la apoptosis, las formas inactivas procaspasas se activan y dan lugar a las caspasas iniciadoras (8 y 9), que a su vez activan las caspasas ejecutoras (3, 6 y 7). A continuación, tiene lugar la fragmentación del ADN por medio de las endonucleasas, la destrucción de las proteínas nucleares y el citoesqueleto, el ‘*crosslinking*’ o entrecruzamiento de las proteínas, así como la expresión de ligandos para la fagocitosis y la formación de pequeñas vesículas (cuerpos apoptóticos) que se retiran eficientemente por las células adyacentes con capacidad fagocítica (20,25–30). Asimismo, existen otras proteínas que participan y regulan en este proceso. Entre ellas, destacan p53 y la familia de proteínas Bcl-2 que incluye proteínas proapoptóticas, proteínas BH3 y proteínas antiapoptóticas que actúan a diferentes niveles (4,20,31). Se pueden distinguir dos vías dentro de la apoptosis: intrínseca y extrínseca (Figura 5).

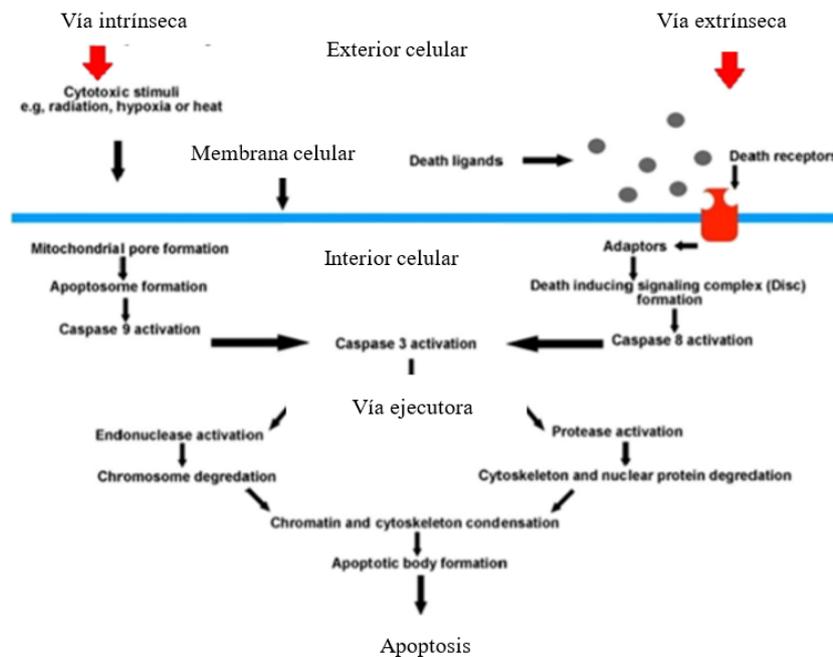


Figura 5. Figura modificada de D’Arcy (27). Vía intrínseca y extrínseca de la apoptosis. Independientemente de la vía, finalmente la activación de la caspasa 3 conduce a la formación de los cuerpos apoptóticos y se produce la muerte celular.

La apoptosis intrínseca, también conocida como apoptosis por vía mitocondrial, es un tipo de MCP desencadenada por alteraciones intra- y extracelulares, y es llevada a cabo por maquinaria intracelular (20,27). Ya sea por inducción positiva o negativa, se activan de genes proapoptóticos como *PUMA*, *NOXA* y *BAX* (27,29,30). La caspasa 9 inicia el proceso y tiene lugar la apertura del poro de la membrana mitocondrial (MOMP), de modo que múltiples proteínas como el citocromo c, Smac/Diablo and HtrA2/ Omi, salen de la mitocondria hacia el citoplasma y continúan con el proceso (4,5,20,27,28,30–33). Finalmente, se activan las caspasas 3 y 7, responsables de la destrucción celular (14,20,26–28,30,34).

Por otro lado, la vía extrínseca también se trata de una MCP desencadenada por alteraciones extracelulares (20). Está controlada fundamentalmente por dos receptores de la membrana plasmática: receptores de muerte-específicos, que se activan cuando se unen al ligando correspondiente, y receptores dependientes, que se activan cuando los niveles del ligando correspondiente disminuyen por debajo umbral (4,20,26,27). Dentro de los receptores de muerte-específica se incluyen el receptor de superficie celular Fas (FAS) y la familia de receptores TNF (factor de necrosis tumoral) (20). Finalmente, la vía extrínseca se activa a través de la caspasa 8 o de la caspasa 10 que conduce a la activación de la caspasa 3, como ocurría en la vía intrínseca (14,20,26–28,34).

En condiciones normales, la apoptosis retira las células con daño celular para mantener la homeostasis y, a su vez, sirve como vía supresora de tumores. Sin embargo, las células tumorales pueden presentar mutaciones y alteraciones que les permitan evadirla como ya se ha comentado, de modo que proliferan de manera descontrolada. Distintas mutaciones en el gen *TP53* o alteraciones en la familia de Bcl-2 hacen que las células tumorales sean ‘inmunes’ a los estímulos proapoptóticos (4,26,28–30). Dentro de las armas terapéuticas, se ha visto que la irradiación de células tumorales puede hacer que sobreexpresen receptores de muerte de la vía extrínseca, de modo que son más susceptibles (14).

### 1.3.3. NECROPTOSIS

La necroptosis es un tipo de muerte celular similar a la necrosis, pero altamente regulado (MCP) (14,20,24,27,35). Se desencadena por eventos que son detectados por receptores de muerte-específicos (14,27). Requiere de la activación del receptor que interacciona

con las quinasas 1 y 3 (RIPK1 y RIPK3) que activa la proteína MLKL; ésta se traslada a la membrana plasmática produciendo una disrupción que conduce a la muerte celular cuando la apoptosis no tiene lugar (14,20,27,28,35). Este tipo de muerte celular está relacionada con enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas, infecciones virales, así como en el contexto tumoral y la respuesta a tratamientos quimioterápicos.

#### 1.4.SENESCENCIA

La senescencia es un proceso desencadenado en respuesta a factores externos o internos que producen un daño irreparable, con el objetivo de no transmitirlo a la descendencia (36). Está mediado por proteínas supresoras de tumores, como p53 o p16/Rb. De este modo, tumores que presentan mutaciones en estas vías pueden eludir las señales para entrar en estado senescente (36), pero también se pueden inducir la expresión de estas proteínas mediante diversas armas terapéuticas como la RT, bloqueándose así el ciclo celular (14,36,37).

Se ha visto que la senescencia puede tener un papel dual en la carcinogénesis. Por un lado, actúa como agente protector frente a células que presentan alteraciones deteniendo su ciclo celular. En el contexto de la aparición de las células tumorales, se trataría de un mecanismo supresor de tumores. En cambio, a medida que se acumulan células en estado de senescencia, pueden aparecer enfermedades, entre ellas, el cáncer (36).

Hay un tipo de senescencia inducida por oncogenes (*oncogene-induced senescence* - OIS) que actúa como mecanismo supresor de tumores. Inicialmente los oncogenes inducen un estado proliferativo alto, pero progresivamente estas células entran en senescencia (36–39).

Son múltiples las situaciones estresantes que pueden inducir la senescencia, entre ellas la RT y la autofagia.

## 1.5.AUTOFAGIA

Etimológicamente, la palabra autofagia proviene del griego *auto-* (a sí mismo) y *-phagos* (comer). Se trata de un proceso homeostático y catabólico caracterizado por el secuestro selectivo de contenido citoplasmático en exceso o deteriorado, ya sean macromoléculas u orgánulos, formando lisosomas/vacuolas (Figura 6) (19,20,45–49,27,29,39–44).

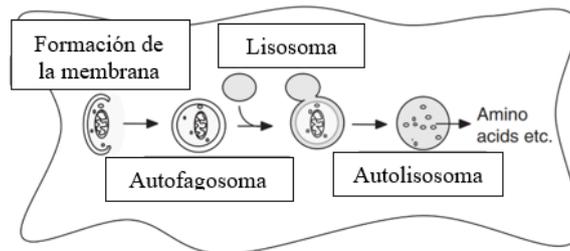


Figura 6. Esquema modificado de Mizushima *et al.* (44). Formación del autofagosoma de doble membrana, su unión al lisosoma para formar el autolisosoma.

Hay tres tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia, y macroautofagia (Figura 7) (19,27,52,39,41,45,46,48–51). La autofagia mediada por chaperonas se reserva para un subgrupo de proteínas solubles sin plegar que contienen la secuencia KFERQ que es reconocida por la proteína chaperona citosólica HSPA8/HSC70; esta se une a la proteína LAMP2A y desencadena la degradación del contenido sin la necesidad de formación de una vesícula (19,27,49,50,53–55). Durante la microautofagia se produce la formación del lisosoma alrededor del material citoplasmático por invaginación de la propia membrana lisosomal (19,27,49,50,53,54). En el caso de la macroautofagia, generalmente el tipo al que se hace referencia cuando se habla de autofagia y así será a partir de ahora en este documento, se forma un autofagosoma para retirar el material citoplasmático y se fusiona con las vacuolas lisosomales (19,27,46,49,50,53,54).

La autofagia se inicia con la formación de una estructura de doble membrana, su elongación y separación para formar el autofagosoma, que engloba el componente citoplasmático, la fusión con los lisosomas, y la degradación mediante enzimas hidrolasas lisosomales, todo llevado a cabo por macrocomplejos proteicos (*core autophagy machinery*) (14,37,57,39,41,45,48,50–52,56). El proceso está controlado por las proteínas codificadas por los genes *ATG*.

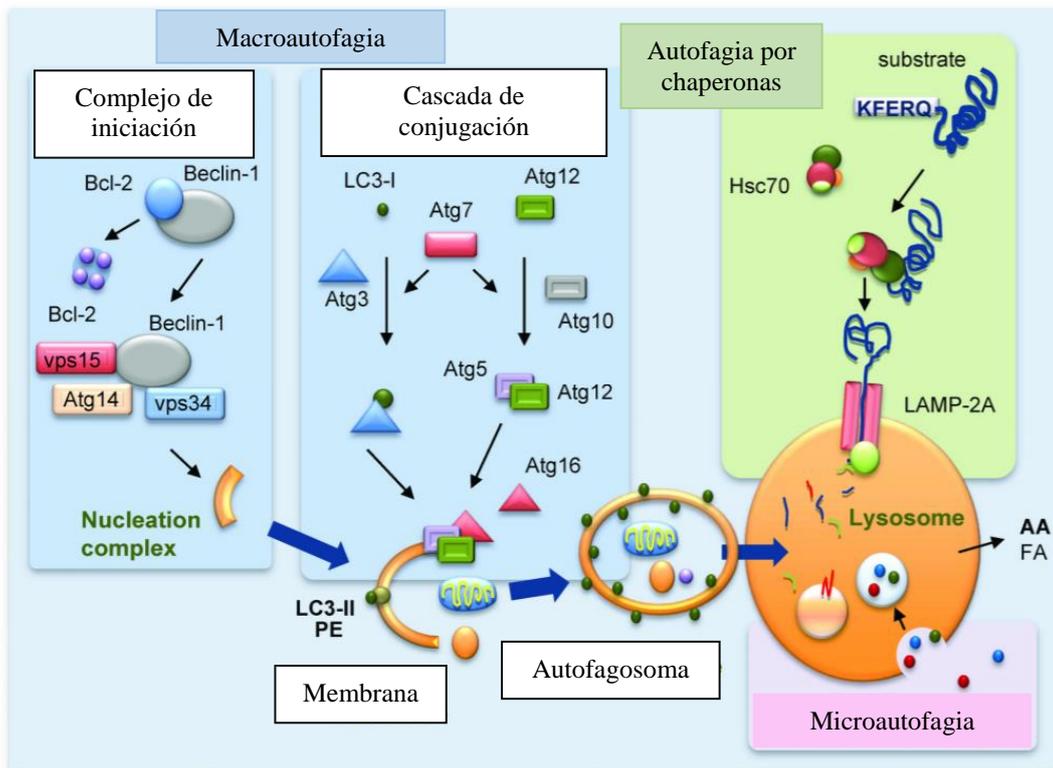


Figura 7. Esquema modificado Singh y Cuervo (46). Las tres vías de la autofagia: mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia.

Respecto al contenido a degradar, se trata de un proceso selectivo que es reconocido a través de interacciones con proteínas receptoras específicas. Una de las principales proteínas encargadas es la proteína p62/sequestosoma1 (SQSTM1) que se une directamente a sustratos poli- o monoubiquitinas a través de su dominio UBA y a la proteína LC3, de modo que queda expuesto al proceso autofágico (19,47,53). Alteraciones en la autofagia que impiden la selección del contenido a degradar conllevan una acumulación de p62 (58). Además, la proteína p62 participa en la tumorigénesis a través del control los niveles de ROS y respuesta a proteínas mal plegadas (*unfolded protein response* - UPR), así como la progresión de la mitosis (59).

Una vez detectado el contenido a degradar, se desencadenan las sucesivas etapas de la autofagia (Figura 8):

- **Inducción del fagóporo y nucleación.** Tiene lugar gracias a la proteína mTOR que actúa como un regulador negativo de la autofagia reconociendo condiciones de riqueza de nutrientes, y a la quinasa AMPK (proteína quinasa monofosfato-activado) que actúa como inductor cuando hay escasez de nutrientes (50,60–62).

Cuando mTOR se inactiva o se da un aumento en la actividad de la quinasa AMPK, se forma el complejo proteico ULK1-2 que activa mediante fosforilación el complejo con actividad fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) de la clase III (PI3KC3) (19,27,62,47,50,52–55,60,61). El complejo PIK3C3, también conocido como complejo VPS34, incluye a las proteínas Beclin-1, la molécula de activación de Beclin-1 (AMBRA1), ATG14 y p150.

Bajo condiciones de estrés ULK1 fosforila AMBRA1, permitiendo que el complejo PI3KC3 se desplace del citoesqueleto al fagóporo y que se genere fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3), crítico para la elongación del fagóporo. Por otro lado, la proteína Beclin-1 interacciona con PIK3C3 a través de Vps34, se activa y se desplaza al fagóporo, promoviendo su actividad catalítica e incrementando el nivel de fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3) (47,50,52,53,60–63). Asimismo, la proteína PIK3C3 interactúa con ATG14 y aumenta la actividad quinasa de PIK3C3 induciendo el proceso autofágico.

Por el contrario, cuando se da una situación de abundancia de nutrientes, PIK3C3 interacciona con UVRAG e inhibe el proceso (52,55,64–70).

Es decir, el complejo PI3KC3 es esencial en el proceso autofágico y regula la ruta eficazmente, uniéndose a una u otra proteína de forma que la regulación puede ser positiva o negativa.

- **Elongación del fagóporo y expansión de la membrana del autofagosoma.** En esta etapa intervienen principalmente dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina. PIP3 de la fase anterior se une a las proteínas WIPI1 y WIPI2, y cataliza las dos primeras reacciones de conjugación que conducen a la elongación de la membrana. Por otro lado, el complejo ATG5/ATG12/ATG16 produce la conjugación de LC3-I con fosfatidiletanolamina para formar LC3-II que se une a la superficie externa e interna del autofagosoma recién formada. El complejo ATG9 también participa en la expansión de la membrana del fagóporo promoviendo el reclutamiento de lípidos (19,27,75–77,47,52,53,62,71–74).
- **Maduración del autofagosoma y degradación del material celular.** Los autofagosomas maduros se fusionan con los lisosomas o con endosomas tardíos, que más tarde se fusionarán con lisosomas, formando el autofagolisosoma. Esto se produce gracias a la presencia de LAMP2 y Rab7 (GTPasa). Dicha unión también le proporcionará enzimas hidrolíticas encargadas de la digestión de la carga autofágica por las hidrolasas lisosomales (47,52,53,62,78–83). Cuando el

autofagosoma está maduro, LC3-II de su membrana se separa de la fosfatidiletanolamina mediante la acción de ATG4 y vuelve al citoplasma como LC3-I.

Los productos degradados se transportan al citosol y se utilizan para sintetizar nuevas proteínas y mantener las funciones celulares en condiciones de ayuno.

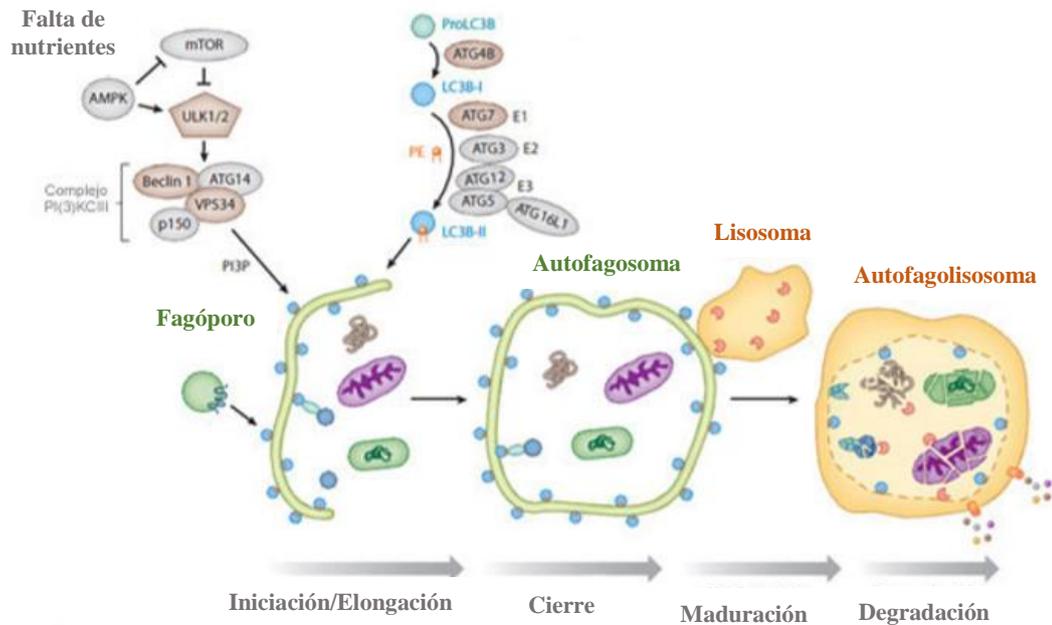


Figura 8. Esquema modificada de Santana-Codina *et al.* (84). Principales mecanismos moleculares de la autofagia: iniciación, elongación, maduración y degradación. El contenido a degradar queda retenido en el fagóporo de doble membrana y forma el autofagosoma que se fusiona con el lisosoma. En su interior, se produce la degradación del contenido. En condiciones ricas en nutrientes, mTOR se activa y la autofagia es inhibida mediante la represión de ULK 1 y 2. Cuando hay escasez de nutrientes, el complejo ULK1–2 y PI3PC3 promueven la iniciación de la autofagia.

Respecto al origen de la membrana de los autofagosomas es muy discutido. Una primera hipótesis apuesta porque se forma *de novo* a partir de depósitos de ATG9 que llegan hasta los endosomas tardíos marcados con LC3 desde el aparato de Golgi en un proceso dependiente de ULK1 y ATG13 (85–89). Otra de las hipótesis apunta que se origina de orgánulos como el retículo endoplasmático (RE), mitocondria o membrana plasmática. La activación de este proceso se alcanza por la síntesis de PIP3 por parte de estas membranas que atrae a otras proteínas responsables de la evaginación y desprendimiento de esa porción de la membrana, formando así los fagóporos o membranas de aislamiento, que englobarán el contenido a degradar y actúa como plataforma para la formación del autofagosoma (55,87).

### 1.5.1. Autofagia y cáncer

La homeostasis celular requiere de un equilibrio constante entre los procesos de catabolismo y anabolismo. La autofagia tiene un papel esencial en el mantenimiento de la fisiología celular, así como en el desarrollo, diferenciación y remodelado tisular. De esta manera, alteraciones en la vía de la autofagia o en sus genes, se relacionan con enfermedades tales como el cáncer, diversas infecciones, la obesidad, el envejecimiento y desórdenes neurodegenerativos (14,20,90,27,37,47,48,52,54,62,84). En el contexto de la enfermedad tumoral, la autofagia se caracteriza por una doble función (14,37,40,42,56,84,90–92).

Inicialmente, desarrolla un papel como supresor de tumores que consiste en tres mecanismos: 1) retirada del contenido citoplasmático dañado, 2) limitación del crecimiento celular y la inestabilidad genómica, 3) promoción de la inmunovigilancia. Es decir, tiene un papel protector ante el estrés oncogénico.

Sin embargo, a medida que la enfermedad avanza, la autofagia puede ser inducida en microambientes con escasez de oxígeno y nutrientes, así como la acumulación de agentes oxidativos, proteínas, calcio, especies reactivas de oxígeno y amonio. En situaciones de alta demanda de nutrientes y oxígeno, las células tumorales se encuentran en estrés metabólico e hipoxia, sobre todo en aquellos tumores pobremente vascularizados. Como consecuencia, existen niveles elevados de autofagia en las células del interior del tumor, actuando como mecanismo de supervivencia y quedando protegidas frente a la apoptosis y la necrosis (93). Por otro lado, la autofagia contribuye a la supervivencia celular mediante la retirada de macromoléculas y orgánulos dañados como consecuencia de las diversas armas terapéuticas, es decir, les confiere resistencia frente a agentes quimioterápicos y radiación ionizante (37,84). De hecho, la inhibición de la autofagia ha demostrado aumentar la sensibilidad ante una gran variedad de tratamientos (93). Es decir, en fases más avanzadas de la enfermedad la autofagia protege a las células tumorales, y facilita la diseminación y aparición de metástasis. En este sentido, se ha descrito que la disminución en la expresión o delección de genes relacionados con la autofagia se traduce en una disminución de los niveles de autofagia y esto ha demostrado una reducción en la supervivencia celular y tumorigénesis en las células tumorales (37,91,93–95).

## 1.6. TRATAMIENTO DEL CÁNCER

El tratamiento del cáncer engloba diferentes herramientas, como son la cirugía, la quimioterapia, la inmunoterapia, la RT, etc. El uso de estas técnicas por separado, pero sobre todo combinadas en determinadas circunstancias, han supuesto una auténtica revolución para esta rama de la medicina.

Se estima que más de la mitad de los pacientes con cáncer necesitarán un tratamiento con RT en algún momento de la evolución de la enfermedad, ya sea con intención curativa o paliativa, variando según el tipo de cáncer y origen/procedencia del paciente (96,97). La RT es responsable de al menos el 40% de las curas del cáncer (14,20,98,99).

### 1.6.1. RADIOTERAPIA

#### 1.6.1.1. GENERALIDADES

La RT es un tratamiento frente al cáncer en constante evolución desde el descubrimiento de los rayos X por Röntgen en 1895, de la radiactividad por Becquerel en 1896, del radio por Curie en 1898 y el primer tratamiento curativo de un tumor en 1897. La revolución tecnológica de las últimas décadas ha permitido aumentar la precisión de la misma mejorando los resultados a nivel local, reduciendo toxicidad en los órganos sanos en riesgo (OSR) adyacentes y valorar el efecto sumatorio con otros tipos de tratamientos sistémicos, tanto a nivel local como sistémico, como nuevas estrategias terapéuticas (100).

La forma de administrar la RT puede ser externa o interna. La RT externa administra radiación ionizante sobre la superficie del paciente en unidades de cobalto o aceleradores lineales mediante la aceleración de fotones, electrones, protones o partículas pesadas. Actualmente son más frecuentes los aceleradores lineales y los fotones, con una energía variable entre 4 y 25 MV. En el caso de la braquiterapia, tanto en la modalidad de baja tasa (LDR) como de alta tasa (HDR), permite administrar RT interna mediante la colocación de la fuente de radiación en el propio tumor o adyacente permitiendo una dosis muy alta en el mismo. Otra forma de administración RT interna es la radioterapia intraoperatoria (*intraoperative radiotherapy* - IORT) en el propio acto quirúrgico que

permite administrar la dosis total en una sesión, como tratamiento único o como parte de un esquema combinado junto con RT externa.

La dosis total de un tratamiento de RT se administra en un número determinado de sesiones o fracciones, recibiendo una dosis fija en cada una de ellas, es lo que se conoce como fraccionamiento. Para el éxito del tratamiento y determinar la dosis total administrada, hay que tener en cuenta las propiedades de cada tejido y su respuesta a la radiación ionizante, es decir, la radiosensibilidad. Por ello, los tratamientos de RT requieren un proceso muy complejo en el que oncólogos radioterápicos y radiofísicos se emplean a fondo para determinar el mejor fraccionamiento y plan de tratamiento que permita cubrir el volumen que se ha definido como tumor más un margen de seguridad (*planning target volume* - PTV) con la máxima dosis posible, a la vez que cumpla los límites de dosis permitidos en los OSR.

Las nuevas técnicas han permitido una escalada de dosis por fracción, variable según la histología y la localización, hasta alcanzar un hipofraccionamiento extremo, es decir, aumentar la dosis administrada por sesión en un número menor de sesiones (entre 1 y 8 fracciones). Es lo que se llama radioterapia estereotáctica fraccionada con intención ablativa, ya sea a nivel cerebral (*stereotactic radiosurgery* – SRS) o corporal (*stereotactic body radiation therapy* – SBRT). La dosis total administrada con estos fraccionamientos equivale a una dosis mayor que la que alcanzan los esquemas de tratamiento convencionales.

A pesar de la mejora en cuanto a técnicas de imagen y planificación, los OSR adyacentes al tumor también reciben parte de esta irradiación responsable de los efectos secundarios. Ante un tratamiento de RT, se debe valorar el equilibrio entre el resultado que vamos a obtener a nivel tumoral y la toxicidad que vamos a producir. Los efectos secundarios a corto, medio y largo plazo van a depender de la dosis total y por fracción, proximidad a OSR y tratamientos combinados con cirugía, quimioterapia o inmunoterapia (100–102).

Con el objetivo mejorar el resultado del tratamiento antitumoral, se ha intentado combinar la RT con diversos agentes sistémicos que actúan no solo a nivel de las propias células tumorales, sino también a nivel del microambiente tumoral y sistema inmune.

### 1.6.1.2.Efecto biológico de la radioterapia

La irradiación de una lesión cancerosa consiste en la administración de energía con el objetivo de inducir la muerte de las células tumorales. Entender cómo actúa la RT a nivel celular y molecular es fundamental para seguir avanzando en el ámbito clínico. No obstante, este concepto de radiosensibilidad se ha ido puliendo con los avances de los últimos años. Los efectos de la radiación en los sistemas biológicos son varios y diferentes a lo largo del tiempo (Figura 9). Primero tienen lugar efectos físicos, después químicos y, por último, biológicos que empiezan con reacciones enzimáticas que ya se ven al final de la fase química, sobre todo a nivel del ADN. Los efectos físicos consisten en las interacciones que se producen entre las partículas cargadas empleadas para la irradiación y los átomos del sistema biológico que se está tratando, sobre todo con los electrones de su órbita produciendo su ionización, incluso su excitación si alcanzan niveles mayores de energía (29,99). La ionización y excitación produce la rotura de uniones químicas y se forman radicales. Los efectos biológicos comienzan al final de la fase química con una serie de reacciones enzimáticas que conducen a un daño en el ADN. La mayoría de las lesiones pueden ser reparadas. En caso de no ser posible dicha reparación, se produce la muerte celular (29). A pesar de que se produzca la muerte celular, las células pueden entrar en división mitótica antes, de modo que se sigue viendo efecto durante las primeras semanas o meses tras la exposición a RT, responsables del efecto antitumoral y efectos secundarios agudos (29,103). Por otro lado, se produce una proliferación celular compensatoria que ocurre tanto en tejidos sanos como tumorales (29,103). De manera tardía, la exposición a la radiación ionizante tiene traducción en forma de efectos secundarios tardíos como fibrosis, telangiectasias, daño en médula espinal o vasos, incluso a largo plazo pueden aparecer segundos tumores.

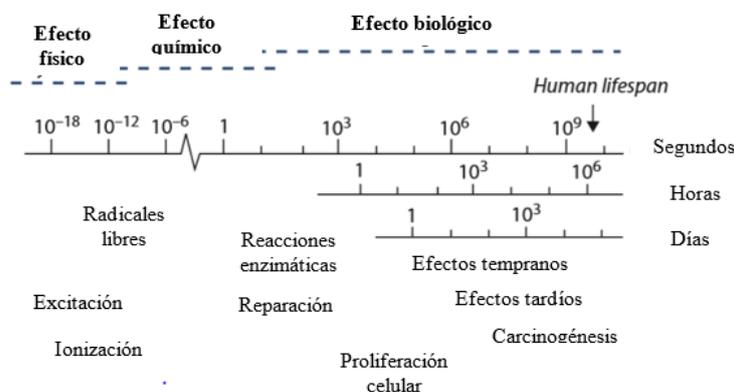


Figura 9. Esquema modificado de Joiner y van der Kogel (29). Sucesión de los efectos físicos, químicos y biológicos tras la administración de radiación ionizante sobre sistemas biológicos.

### 1.6.1.3. Daño en el ADN

Al administrar radiación ionizante, inicialmente se produce un daño en el ADN (Figura 10) por ionización de los átomos mediante la ‘eyección’ de electrones que genera una rotura en la cadena simple (RCS) y en la cadena doble (RCD). Esos electrones, a su vez, ionizan moléculas adyacentes hasta que progresivamente van perdiendo potencia. La administración de 1 Gy produce 105 ionizaciones en una célula, más de 1000 daños en bases de ADN, aproximadamente 1000 RCS y entre 20 y 40 RCD (27,104,111).

El daño producido por la irradiación puede ser letal o subletal a nivel celular. El daño letal es irreversible y conduce a la muerte celular. En cambio, sobre los daños subletales actúan diversos mecanismos de reparación, de manera que la célula puede recuperarse por completo, sufrir una transformación o incluso morir cuando se acumulan múltiples daños subletales.

El daño producido por la irradiación puede ser letal o subletal a nivel celular. El daño letal conduce a la muerte celular, es lo que se conoce como un efecto biológico determinista de naturaleza somática y dosis dependiente, a partir de una dosis umbral, que puede aparecer de forma inmediata o a corto-medio plazo. En cambio, sobre los daños subletales actúan diversos mecanismos de reparación, de manera que la célula puede recuperarse por completo, sufrir una transformación o incluso morir cuando se acumulan múltiples daños subletales. En el caso de la transformación (mutación) aparecen los efectos biológicos estocásticos ya sea de naturaleza somática (irradiación de células somáticas) o hereditaria (irradiación de células germinales), que aparecen de forma tardía e independiente a la dosis recibida.

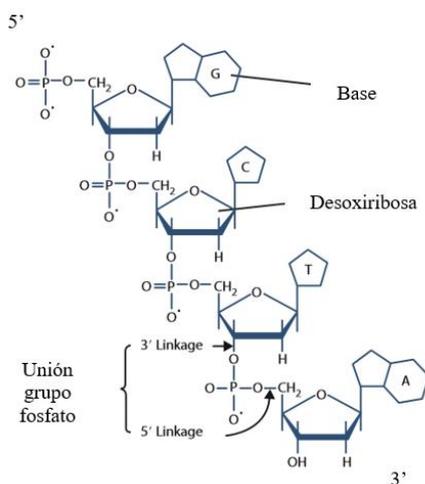


Figura 10. Esquema modificado de Joiner y van der Kogel (29). Estructura del ADN, sus cuatro bases (G, C, T, A) están unidas por desoxirribosa y un grupo fosfato. La secuencia de bases determina la secuencia de los aminoácidos (ää).

Con el objeto de sobrevivir, la célula ha desarrollado complejos sistemas para detectar y reparar el daño tanto de origen interno, como la oxidación, y externo, como los agentes químicos o físicos, entre ellos la radiación ionizante (29,105). No obstante, esta capacidad de reparación es limitada y numerosos daños sucesivos pueden conllevar finalmente a un daño letal. De los daños producidos por RT, la muerte celular se correlaciona con la dosis recibida en núcleo celular, y no con la recibida por la membrana o el citoplasma (29).

La respuesta al daño de ADN (RDA) es un sistema muy complejo con múltiples vías (29,104). Cuando se produce un daño, este se detecta a través de los sensores que transmiten dicha información a través de transductores a los efectores, estando regulado por otras proteínas llamadas activadoras o adaptadores (29). Los efectores actúan a través de tres vías: 1) muerte celular programada, 2) reparación del ADN, y 3) bloqueo temporal o permanente de la progresión del ciclo celular (29). También por la radiación ionizante tienen lugar efectos adaptativos en la transcripción génica, traducción del ARNm, así como modificación y degradación proteica (29). Las alteraciones en el ADN pueden ser de distintos tipos: modificaciones de las bases nitrogenadas, entrecruzamientos, rotura en la cadena simple (RCS) y en la cadena doble (RCD). Los principales mecanismos de reparación para los daños pueden ser directos o indirectos: reparación de rotura de cadenas simple (RRCS) y reparación de rotura de doble cadenas (RRCD), que incluyen reparación de escisión de bases (*base excision repair* - BER), reparación de la escisión de nucleótidos (*nucleotide excision repair* - NER), reparación por apareamiento erróneo de las bases (MMR), reparación por unión de extremos no homólogos (*Non-homologous end joining* - NHEJ) y la reparación por recombinación homóloga (RH) (29,106–108).

La vía de reparación directa es capaz de reparar el ADN en un único paso, sin necesidad de substituir la base dañada. Esto se da en las siguientes situaciones: dímeros de pirimidina resultantes de la exposición a luz ultravioleta y las bases modificadas por la adición de un grupo metilo o etilo debido a agentes alquilantes (108,109). Una situación concreta es la metilación de restos de guanina para formar O<sup>6</sup>-metilguanina, que forma pares de bases complementarias con timina en lugar de citosina (108,109). Esto puede ser reparado por la enzima O<sup>6</sup>-metilguanina ADN metiltransferasa (MGMT) que elimina los grupos metilo de la guanina (108,109).

BER, MMR y NER se encargan de reparar los daños en una sola cadena del ADN. En el caso de BER (Figura 11), las bases dañadas son reconocidas y retiradas por enzimas glucosilasas especializadas, generando un sitio sin base. Esto es reconocido por APE (AP endonucleasa) que permite retirar el nucleótido por completo). A continuación, la base dañada es sustituida de manera individual o junto a otros nucleótidos adyacentes. En el primero, la base es sustituida mediante la ADN polimerasa  $\beta$  (POL $\beta$ ) y unida gracias a la ADN ligasa 3 (LIG3); en el segundo, se sustituyen los nucleótidos de alrededor por ADN polimerasa, FEN1 (endonucleasa Flap 1) retira los nucleótidos salientes, seguido de su unión por la ligasa 1 (LIG1) (29,108,109). Se ha visto que alteraciones en estas enzimas pueden reducir la reparación del daño producido por radiación ionizante y, por tanto, alterar la radiosensibilidad (29,108,109).

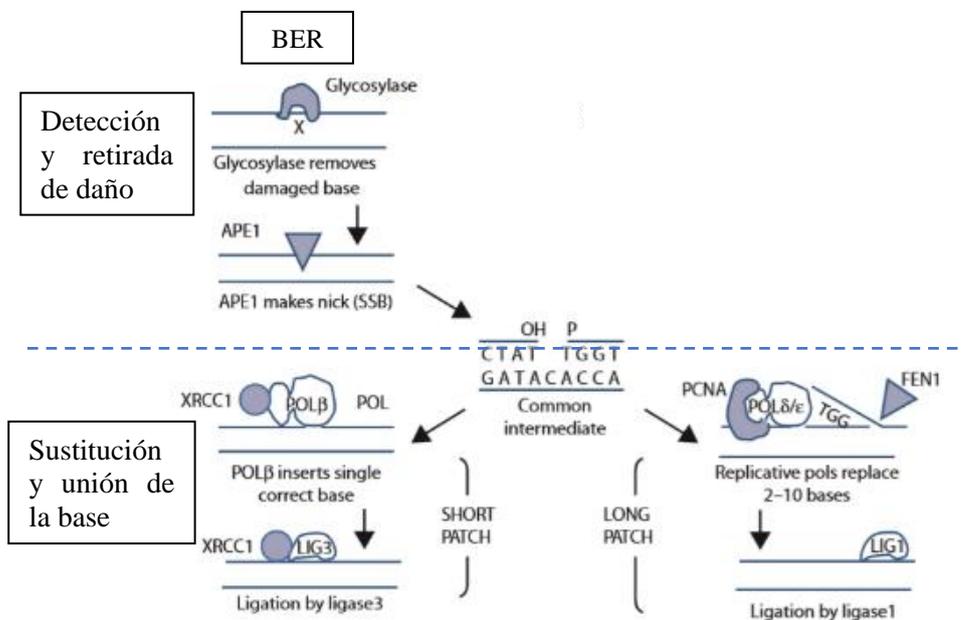


Figura 11. Esquema modificado tomado de Joiner y van der Kogel (29). Mecanismos de reparación de RCS: BER y RRCS tras detectar un daño en las bases del ADN, seguido de las dos vías de reparación.

Otros mecanismos de subsanación del ADN son la MMR durante la replicación o la NER tras la exposición a luz ultravioleta o fármacos como el cisplatino. Sin embargo, se ha visto que mutaciones en estas vías no influyen en la respuesta al daño producido por la RT, por lo que se deduce que no son importantes como mecanismos de reparación tras irradiación ionizante (29,108). La NER se encarga de reparar lesiones voluminosas, distorsiones en la hélice y grandes aductos de ADN cuando solo una de las dos hebras está afectada. La MMR, por su parte, se encarga de eliminar las bases despareadas que aparecen tras daños espontáneos, desaminación de las bases, oxidación, metilación y tras

fallos en los procesos de replicación o recombinación, ayudando a mantener la estabilidad genómica y reducir las mutaciones durante la replicación.

Ya sea por acumulación de otros daños o por efecto directo, se puede producir RCD, el daño más letal. Los dos mecanismos principales de reparación de los daños de doble cadena son la RH y la NHEJ, según la estructura de la cromatina y la fase del ciclo celular (Figura 12) (29,99,108). Aproximadamente el 90 % de la cromatina se encuentra como eucromatina y típicamente se repara mediante la NHEJ; el 10 % restante está en forma de heterocromatina y su reparación depende del ciclo celular en el que se encuentre, de modo que en G1 y S temprana se reparan mediante la NHEJ, mientras que en G2 lo hace mediante la RH (29). La RH emplea la cromátida sin defecto como modelo para reparar dicho daño, mientras que la NHEJ no lo hace, de modo que la RH es un método mucho más preciso.

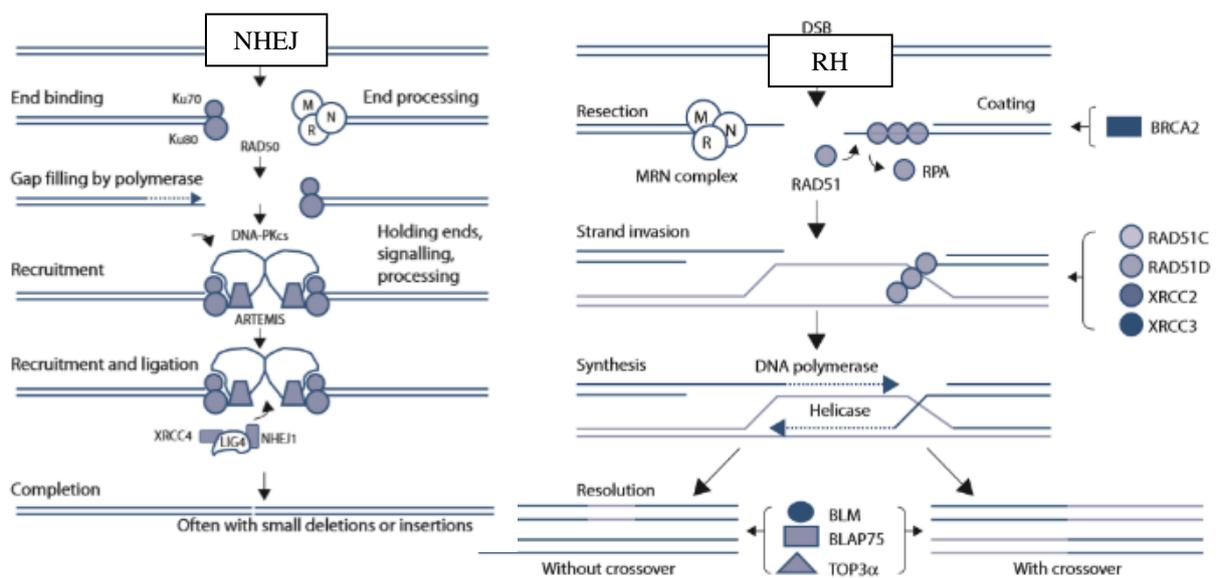


Figura 12. Esquema modificado de Joiner y van der Kogel (29). Mecanismos de reparación RCD: NHEJ y RH, tras detectar un daño.

La NHEJ une dos extremos de la cadena de ADN sin necesidad de una secuencia complementaria ni homóloga (Figura 12). Se produce la unión del heterodímero Ku70/80 con el final de la cadena de ADN. El heterodímero de Ku70 y Ku80 se une a la rotura de doble cadena con una alta afinidad, protegiendo el ADN de la acción de las exonucleasas, y recluta quinasas dependientes de ADN (ADN-PKs) asociándose al dominio catalítico de éstas (29,108). La quinasa polinucleótida (PNK), la endonucleasa ARTEMIS y las polimerasas procesan dicho daño para facilitar la unión por la ligasa ADN 4, XRCC4 y

NHEJ1. En caso de no ser compatibles los extremos, se recortan los fragmentos necesarios. Una vez que los extremos son compatibles, son ligados gracias a un complejo constituido por XRCC4, XLF y la ADN ligasa IV (29,108). A pesar de no ser una reparación perfecta y la posibilidad de que surjan deleciones, inserciones o mutaciones, es el mecanismo de reparación fundamental de RCD en fase G1, de modo que alteraciones en dichas proteínas produzcan una gran radiosensibilidad (29). Estos posibles defectos no son críticos para la célula, puesto que el genoma es rico en secuencias muy repetitivas.

Por su parte, la RH utiliza la cadena no dañada como plantilla para reparar el daño, resultando en un proceso mucho más exacto, siendo el mecanismo de reparación por excelencia al final de la fase S y G2, momento en el que las células son más radorresistentes. En cada punto de rotura de la cadena se crean regiones de cadena simple gracias a los complejos MRN, formado por Mre11, Rad50 y Nsb1, y otras exonucleasas, así como la colaboración de otras proteínas tales como RPA (29). Se produce la unión de los dos extremos de la cadena doble; a continuación, se activan las quinasas que controlan los *checkpoints* del ciclo celular para detenerlo y se reclutan más proteínas de reparación del ADN (29). Gracias a la exonucleasa Mre11, el complejo genera una cadena sencilla de ADN para iniciar la recombinación. Estas regiones ahora pueden alcanzar la doble cadena de ADN sin daño de la cromátida hermana sana, gracias a RAD51 y XRCC, junto a BRCA2 (29). RAD51 se une al extremo 3', sintetiza un filamento nucleoproteico que busca un área homóloga de esta cadena sencilla de ADN en la cromátida hermana (29). De esta forma, se genera un dúplex entre el ADN de cadena sencilla y el ADN homólogo de la cromátida hermana (29). Una ADN polimerasa va sintetizando el ADN tomando como molde la información de la cromátida hermana (29). Finalmente, se forma una estructura de cadenas entrecruzadas que son resueltas por resolvasas (enzimas con actividad endonucleasa), reparándose el daño en el ADN (29). El complejo RMI formado por BLM, BLAP75 y TOP3 $\alpha$  es importante porque limita el *crossover* del ADN (29).

Por tanto, cualquier alteración en cualquier punto de estas vías, produce alteraciones en los mecanismos de reparación frente al daño en el ADN, modifica la radiosensibilidad y predispone a sufrir cáncer (29,99,106,107,110).

Otro de los puntos clave en la RDA es la activación de los *checkpoints* del ciclo celular. Al administrar radiación ionizante se produce un retraso en la progresión de las células

por las fases G1, S y G2, debido a la activación de cuatro *checkpoints* (Tabla 1) (29,104,111). Esto se consigue por dos mecanismos: 1) la activación de otras proteínas que inhiben estos complejos, los inhibidores de CDK (ICDK), y 2) alteración de la fosforilación y actividad de las CDK (29).

Tabla 1. Modificada de Joiner y van der Kogel (29). ATM: proteína mutada ataxia-telangiectasia.

Ciclina D/CDK4	Ciclina A/ CDK1 y CDK2	Ciclina B/ CDK1
RT → se estabiliza ATM y se activa p53 → regula al alza p21 → inhibe las ciclinas/CDK de la fase G1 → no se fosforila Rb y no pasa a fase S.	RT → reducción en la tasa de síntesis de AD dependiente de la dosis administrada → precisan más tiempo para replicar el ADN	Checkpoint temprano: activado con dosis bajas de RT (1 Gy es suficiente). Checkpoint tardío: activado con dosis altas de RT y es dependiente de ATM
Previene entrar en fase S	Progresión lenta por fase S	Previene entrar en mitosis

Estos *checkpoints* pueden verse alterados por cambios genéticos que ocurren durante la tumorigénesis, dejando de actuar, por lo que las células tumorales continúan progresando en el ciclo celular. Asimismo, las posibles causas son mutaciones en genes responsables de la activación de los *checkpoints*, que provocarían un retraso de la progresión del ciclo celular en respuesta a la irradiación (29). Esto tiene impacto en la inestabilidad genética y progresión tumoral, pero no en la radiosensibilidad (29).

#### 1.6.1.4. Radiosensibilidad y las ‘5 R’ de radioterapia

La radiosensibilidad se define como “la vulnerabilidad de una estructura biológica a la radiación”, concepto basado en características inherentes a la estructura biológica y no al tratamiento. Desde los primeros trabajos sobre radiosensibilidad hasta la actualidad se ha trabajado en distintos fraccionamientos con el objetivo de aumentar el daño en el tumor mediante la reoxigenación de las células hipóxicas y la redistribución en el ciclo celular de las células tumorales entre dos sesiones de RT, así como de permitir a las células sanas recuperarse mediante la reparación del daño subletal y la repoblación de las células (103).

Reoxigenación, redistribución, reparación, repoblación, junto a radiosensibilidad como factor individual de cada paciente frente a la RT, forman lo que se conoce como las ‘5 R de la radiobiología’ (29,103,106,113–115).

- **Reoxigenación.** Las células hipóxicas son más radiorresistentes que las bien oxigenadas, hasta dos o tres veces más. La hipoxia se ha descrito como uno de los principales factores limitantes de la respuesta de los tejidos frente a la irradiación. Cuando mueren las células más cercanas a un capilar, es decir, las mejor oxigenadas, se produce una reoxigenación de aquellas hipóxicas que se encontraban lejos del capilar, lo que aumenta su radiosensibilidad ante la siguiente fracción de irradiación.
- **Redistribución.** La radiosensibilidad varía a lo largo de las diferentes fases del ciclo celular (Figura 13) tal y como se comentó previamente. Por ello, las células que han sobrevivido se mantienen inicialmente en fases más radiorresistentes y pasadas unas horas se ‘mueven’ a otras más sensibles.

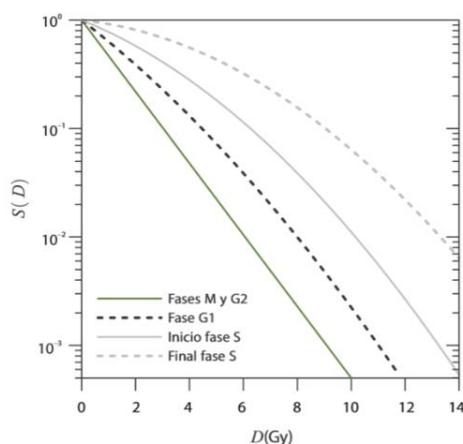


Figura 13. Esquema original tomado de Brosed Serreta (97). Representación de las curvas de supervivencia de una línea celular según la fase del ciclo celular en la que se encuentran cuando se administra la radiación ionizante.

La reoxigenación junto a la redistribución tienen como objetivo aumentar la sensibilidad a la siguiente fracción de irradiación.

- **Reparación.** El tejido irradiado inicia una rápida reparación de las lesiones subletales, que puede llegar a ser completa entre cada fracción de tratamiento. Este fenómeno aparece en los tejidos tumorales y en los sanos adyacentes. La mejor oxigenación de los tejidos sanos permite una reparación mejor y mayor que los tejidos tumorales.

- **Repoblación.** Se trata de un proceso que permite la recuperación del número de células a partir de aquellas que sobreviven a la fracción de RT. Puede ocurrir tanto en el tejido sano (deseable para reparación de las lesiones agudas y tener menos efectos secundarios), como en el tejido tumoral permitiendo su recuperación entre dos fracciones consecutivas, siendo una de las principales causas de fallo de control local en fraccionamientos convencionales.

La repoblación y la reparación otorgan resistencia a los tejidos entre dos fracciones sucesivas.

- **Radiosensibilidad.** Cada tejido presenta una sensibilidad intrínseca a la radiación, teniendo en cuenta diferencias en la RDA, detección y mecanismos de reparación, fraccionamiento. La respuesta a la radiación ionizante varía en función de las primeras 4 R, pero se considera la radiosensibilidad individual como el agente más importante en la respuesta a este tipo de tratamiento.

Los esquemas de fraccionamiento incluyen la dosis por fracción, el número total de fracciones, el tiempo transcurrido entre las sesiones, el tiempo y la dosis totales. Distinguimos tres tipos de esquemas de fraccionamiento que, en líneas generales, presentan las siguientes características (Tabla 2):

Tabla 2. Esquemas de tratamiento con radioterapia según el fraccionamiento (103,115,116).

	Fraccionamiento convencional	Hiperfraccionamiento	Hipofraccionamiento
Objetivo	Equilibrio entre redistribución y reoxigenación de células tumorales, y reparación y repoblación de las células.	Aprovechar las diferencias de radiosensibilidad entre c. tumorales y sanas	Superar a la repoblación de las c. tumorales durante el tratamiento
Dosis/fracción	2 Gy	< 2gy	> 2 Gy
Nº fracciones/día	1	2-3	1
Nº días/semana	5	5	3 (días alternos)
Duración total del tratamiento	Hasta 7 semanas	Hasta 7 semanas	1-3 semanas

Respecto a la toxicidad, tras la administración de una fracción de RT, los primeros efectos los vamos a ver en aquellos tejidos que presentan un índice de proliferación alto, como piel o mucosas, de ahí la aparición de efectos secundarios agudos durante el tratamiento. La tasa de recuperación depende de la dosis y número de células madre supervivientes

(103). De este modo, estos efectos tóxicos se pueden reducir potenciando la repoblación celular (al menos 6 horas entre dos sesiones) y disminuir la dosis total para aumentar la tasa de recuperación (103). Por otro lado, las reacciones tardías (meses o años después) tienen lugar en aquellos tejidos con una proliferación más lenta y son dependientes de la dosis (103). Se pueden reducir con una dosis por fracción de 2 Gy o menos, disminuyendo la dosis total y un intervalo de al menos 6 horas entre fracciones (103).

#### 1.6.1.5. Dosis biológica efectiva o equivalente (BED). Modelo lineal cuadrático.

##### Ratio alfa/beta

Para entender mejor la dosis administrada y el efecto que produce en los diferentes tejidos tenemos que definir el concepto de dosis biológica efectiva o equivalente (BED).

La BED es una medida del efecto (E) producido por un tratamiento de RT continuo o fraccionado (29,97). En el caso de tratamientos de RT fraccionada, es la dosis total que hay que alcanzar mediante múltiples sesiones para conseguir el E deseado. Se define como isoeffecto al efecto biológico sobre un cierto tejido (29,97). La fórmula que define la BED es:  $BED = D [1 + d / (\alpha/\beta)]$ , donde D la dosis total, d la dosis por fracción, y  $\alpha$  y  $\beta$  la ratio característica de cada tejido que se explica más adelante. La dosis total se representa como  $D = nd$ , siendo n el número de fracciones y d la dosis por fracción. Por tanto, la BED es la dosis total teórica que hay que administrar para producir el E usando múltiples fracciones de menor dosis (29). Teniendo en cuenta esto, dos fraccionamientos son equivalentes cuando ambos tengan igual BED y, por tanto, tengan el mismo isoeffecto:

$$n_1 d_1 \times \left(1 + \frac{d_1}{\alpha/\beta}\right) = n_2 d_2 \times \left(1 + \frac{d_2}{\alpha/\beta}\right).$$

El modelo que estima los daños producidos por la radiación, ya sea por efecto directo o indirecto, es el modelo lineal-cuadrático (LQ), descrito por Douglas y Fowler en 1976 (Figura 14) (117). Cada tejido sano o tumor tiene una curva de supervivencia según dos parámetros relacionados por una ratio con la dosis:  $\alpha$ , es el parámetro lineal proporcional a la dosis de radiación, relacionado con el daño letal y responsable de la muerte directa; y  $\beta$ , es el cuadrático, proporcional al cuadrado de la dosis, relacionado con el daño subletal y responsable con la muerte que se produce de manera indirecta por acumulación de daños subletales que ya no se pueden reparar (97,117–119). Por tanto, el coeficiente  $\alpha\beta$  se

corresponde con la dosis donde el evento muerte celular está dado por un efecto directo y otro indirecto, sin que predomine uno sobre otro.

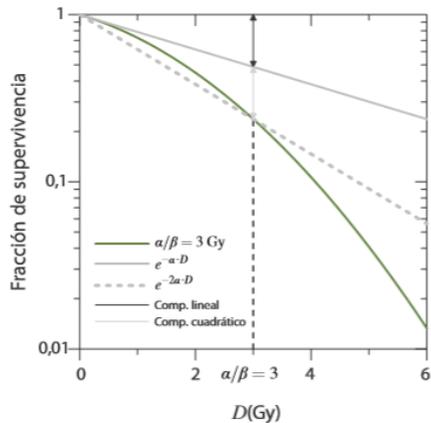


Figura 14. Esquema original tomado de Brosted Serreta (97). Representación logarítmica de una curva supervivencia según el modelo lineal-cuadrático: componente lineal y componente cuadrática.

Tejidos con coeficientes  $\alpha\beta$  altos (en torno a 10 Gy) se caracterizan por una capacidad proliferativa alta y presentan mayor sensibilidad a la radiación; es decir, administrando dosis bajas se produce la muerte celular por acción directa. En cambio, tejidos con coeficientes  $\alpha\beta$  bajos, aproximadamente 3 Gy, requieren una dosis más alta de radiación ionizante, por ser más radiorresistentes, para alcanzar la muerte celular por acumulación de daños subletales. Se relaciona con los efectos tardíos. En general, los tumores presentan coeficientes  $\alpha\beta$  altos.

#### 1.6.1.6. Muerte celular por radioterapia

Como hemos comentado, la RT produce una serie de daños a nivel celular que cuando no se pueden subsanar implican la muerte celular. Hay distintos tipos de muerte celular o estados que acaban en ella tras la administración de RT, dependiendo de diversos factores como características celulares, del microambiente y de la radiación ionizante (14,29,120). Según el momento en el que se produzca el daño celular, podemos distinguir entre muerte o catástrofe mitótica cuando se pierde la capacidad de proliferación celular o muerte de interfase cuando la muerte celular ocurre de forma inmediata antes de que la célula se divida y se ve en aquellas células con alto índice proliferativo. En cambio, la muerte diferida que ocurre tras uno o más intentos de división celular es el tipo más frecuente, tanto en tejidos sanos como tumorales.

La catástrofe mitótica es un mecanismo que impide la proliferación y/o supervivencia de las células que no son capaces de completar la mitosis o inmediatamente después de la

misma, como consecuencia de un daño extenso en el ADN, problemas en el proceso de mitosis y/o fallo en los *checkpoints* (14,16,20,25,29). La catástrofe mitótica no debe considerarse un tipo de MCP como tal, sino que este mecanismo conduce a la muerte celular mediante la inducción de otros tipos de muerte celular, como la apoptosis, la senescencia celular o la necrosis (Figura 15) (14,16,20,121). La catástrofe mitótica tiene un papel importante en procesos carcinogénicos, tanto en el origen como en la progresión. Varios tratamientos incluyendo agentes quimioterápicos y RT tienen relación con este proceso. De hecho, la catástrofe mitótica es considerada el mayor responsable de la muerte celular en las células proliferantes irradiadas (14,29).

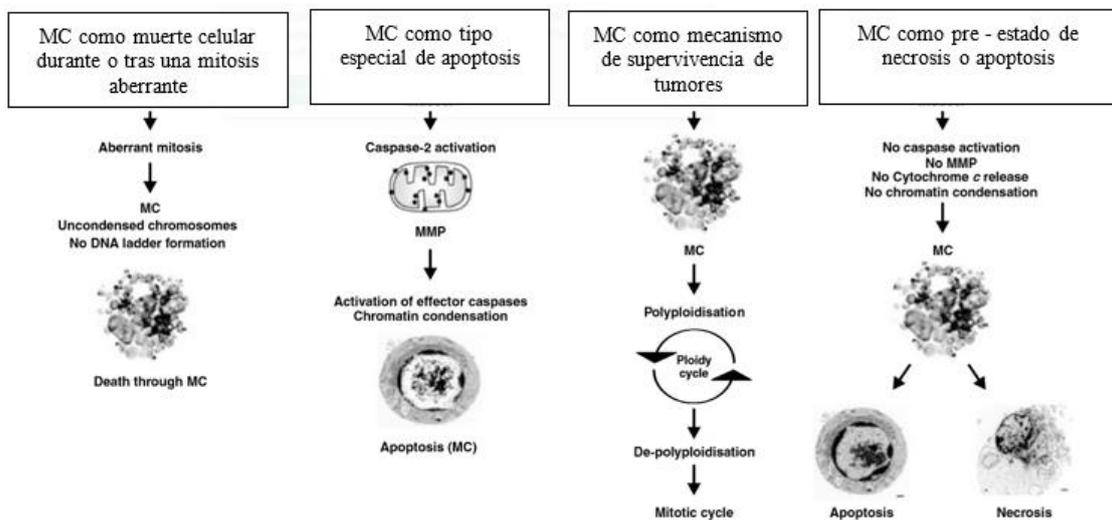


Figura 15. Figura modificada de Vakifahmetoglu *et al.* (16). Vías por las que la catástrofe mitótica (CM) conduce a otros tipos de muerte celular.

Otro tipo de muerte celular mucho menos conocido y que se observa en el contexto de la RT es el efecto *bystander*, un fenómeno en el que la célula puede morir por irradiación de células vecinas (29,122). Parece que las células radiadas secretan factores que dañan a las células no irradiadas. Este efecto en las células adyacentes parece tener un papel fundamental cuando se emplean bajas dosis de RT.

En los últimos años ha cobrado fuerza el concepto de muerte celular inmunogénica (*immunogenic cell death* (ICD)) para definir mejor la muerte celular inmunomediada (14). Se ha demostrado que la apoptosis, la necrosis y la autofagia son capaces de inducir respuestas inmunomediadas, y que la necrosis además contribuye a crear un medio inflamatorio crónico que es protumoral e inmunosupresor (14,123–127). Para que tenga

lugar la ICD tienen que darse dos factores: la exposición a la señal dañina de la célula afectada que mostrará patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), para alertar a las células presentadoras de antígeno (CPAs), como las células dendríticas (CDs); y la presentación del antígeno por las CPAs a las células T (14).

Los principales DAMPs son: la calreticulina, el HMGB1 y el ATP (adenosina trifosfato), que actúan sobre CD91, TLR4 y los receptores de las CDs, respectivamente. La calreticulina, una chaperona del RE, pasa a la superficie de la célula como señal preapoptótica. HMGB1 es una proteína de la unión de cromatina relacionada con la necrosis y el ATP se acumula dentro de los autolisosomas de la autofagia (14,123,128,129).

Por otro lado, las altas dosis administradas por fracción también permiten generar un efecto *abscopal* que produce la muerte de aquellas células tumorales que están fuera del campo de radiación mediante la intervención del sistema inmune, aunque los mecanismos exactos aún no están bien establecidos. Este término fue acuñado por primera vez en 1953 por Robin Mole. Procede del latín “*ab*” que significa “fuera de” y “*scopus*”, “diana o blanco”. Se ha analizado el efecto *abscopal* en múltiples estudios que combinaban RT con inmunoterapia para potenciar la respuesta inmune antitumoral (130). No obstante, en la práctica clínica la regresión tumoral más allá de la lesión que recibe el tratamiento de RT en monoterapia es un fenómeno poco frecuente según las series publicadas (130,131).

Como ya se ha comentado, hay otros factores que influyen en la respuesta a la radiación ionizante y el tipo de muerte celular que se va a producir (14,29,120). Las características celulares son determinantes, incluyendo el estado celular, la función de p53 y ATM (proteína mutada ataxia-telangiectasia) (14,29,99,132).

La fase del ciclo celular cuando se administra la radiación ionizante también influye en el tiempo y el tipo de muerte celular. Ya se ha comentado que las células que se encuentran al final de la fase G2 y hasta la mitosis son las más radiosensibles y entran más fácilmente en muerte celular (133). Las células tumorales emplean una redistribución por el ciclo celular como mecanismo de supervivencia.

Otros factores que influyen en el tipo de muerte celular que se va a producir son los propios de la radiación ionizante administrada. El fraccionamiento juega un papel fundamental, de ahí la importancia de tener en cuenta la BED. En este sentido, se ha visto que gracias a las dosis ablativas administradas mediante SBRT o SRS se puede producir muerte celular de forma directa e indirecta a través de la activación del sistema inmune y por daño vascular (14,134). En la práctica clínica, se ha visto que este tipo de fraccionamiento permite doblar la mediana de supervivencia en pacientes oligometastásicos, así como la tasa de respuesta a la inmunoterapia (135,136), apoyando la idea de que la dosis por fracción sí tiene impacto en la respuesta celular. Por otro lado, la calidad de la radiación también puede influir en la muerte celular, medida a través de la transferencia de energía lineal (*linear energy transfer* - LET). Se ha comprobado que las radiaciones con alta LET pueden producir daños en el ADN más complejos que sean más difíciles de reparar (14,120,137,138).

#### 1.6.1.7. Relación entre autofagia y radiaciones ionizantes

Como se describió previamente, la autofagia muestra un papel dual en cáncer. Por un lado, previene la acumulación de productos tóxicos celulares ya que permite transformarlos en material nutritivo con el objetivo de aportar un suplemento energético durante esta situación estresante y mantener el equilibrio homeostático. Son múltiples los trabajos que observan que la autofagia inducida por la RT actúa como mecanismo de protección para las células tumorales ante este agente estresante (14,37,127,139–141,40,42,56,57,84,90–92). Por otro lado, distintos trabajos han descrito que la combinación de RT con diversos agentes farmacológicos potencian la autofagia como muerte celular en lugar de la apoptosis (57,139,142–145).

Cuando se administra radiación ionizante se produce daño en el ADN, ROS y especies reactivas de nitrógeno (*reactive nitrogen species* - RNS) que conducen a un daño en el ADN y a nivel de varios orgánulos celulares, incluyendo la membrana celular, la mitocondria y el RE (Figura 16) (57,141,146). La acumulación de esas especies reactivas dentro y fuera del núcleo produce un estrés en las células, desencadenando la formación de UPR y desequilibrios metabólicos (37,57,141,147–150). Como respuesta frente a dicho estrés y para evitar una posible muerte celular, tiene lugar un proceso de autofagia. Esta inducción se puede observar *in vitro* a nivel proteico, donde en distintos estudios se

ha descrito un aumento de las proteínas relacionadas con la autofagia como LC3 y un descenso de las proteínas p62 y beclin-1 (125,150–152). En este sentido, parece lógico que pensar que a) si inhibimos la autofagia como mecanismo de resistencia frente a la irradiación mediante agentes farmacológicos como la cloroquina o se silencian genes relacionados con la autofagia, o b) si inducimos la autofagia para que conlleve la muerte celular de las células tumorales con otros como el panobinostat, se podría mejorar el resultado obtenido con la radiación ionizante.

Existen múltiples vías donde la autofagia y la RT se relacionan, entre las que se incluyen la reparación del ADN, la generación de ROS, la producción de ceramida o la entrada de calcio al citoplasma celular. Asimismo, la autofagia secundaria a radiación ionizante induce también la activación del sistema inmune (39,57,127). Existen trabajos que demuestran una radiosensibilización *in vitro*, pero una disminución en la respuesta *in vivo* relacionado con un déficit en la señalización inmunogénica (57,125,153). En este contexto y como ya se ha comentado previamente, cada vez cobra más importancia la ICD y estudios recientes han demostrado el papel de la autofagia en la misma bajo el efecto de la RT (14,57,140,154,155).

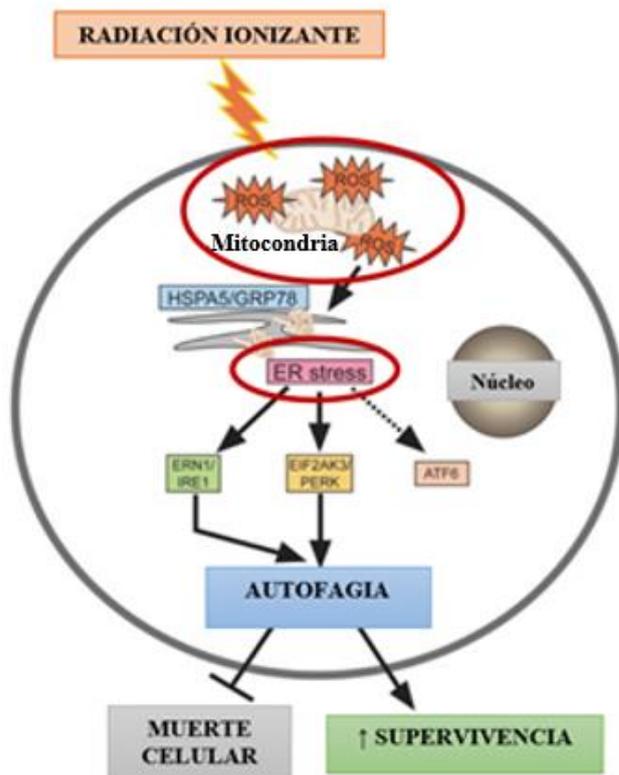


Figura 16. Figura modificada de Chaurasia *et al.* (147). Mecanismos de inducción de autofagia tras la administración de radiación ionizante. Primero se generan ROS en la mitocondria que producen un daño en macromoléculas como ADN y proteínas. Como consecuencia, se acumulan UPR en el RE produciendo un estrés. Esta situación es detectada por el sensor HSPA5/GRP78 y se activa las ramas de las UPR EIF2AK3 y ERN1. Finalmente, se induce la autofagia en condiciones de exposición a radiación ionizante como mecanismos de supervivencia.

#### 1.6.1.7.1. Reparación del ADN y autofagia

La radiación ionizante produce un daño directo sobre el ADN como se ha descrito previamente, pero también se produce un daño indirecto por la producción y acumulación de ROS. Ambos producen defectos de cadena simple y cadena doble, así como oxidación de bases del ADN, que son reconocidos por los sistemas de reparación (141). Tras la detección de un daño directo o indirecto en el ADN por las proteínas MNR y RPA, se reclutan las proteínas ATM, ATR y ADN-Pk que se unen al punto de la lesión y esto induce la unión de otras quinasas desencadenando los mecanismos de reparación correspondientes (57,141,156,157). Esto a su vez activa otras vías como la p53, mTOR o FOXO3a, que a su vez activarán la autofagia (141,146).

En concreto, tras la administración de RT, se genera daño en el ADN, aumenta la expresión de FOXO3a y gracias a su interacción con ATM se produce la activación de esta proteína. A continuación, se produce la fosforilación y activación de p53 (57). Como consecuencia, los niveles de p53 se elevan y se traslada en su mayoría al núcleo. Finalmente, p53 induce la autofagia mediante varios mecanismos: activación de genes relacionados con la autofagia como *PTEN* o *DRAM*, inhibición de la vía PI3K-Akt-mTOR y activación del sensor AMPK (57,158,167,159–166).

En el caso de la vía de la PI3K-Akt-mTOR, esta ruta es una de las más importantes en la regulación de la autofagia. La activación de esta vía por diferentes agentes conduce a la fosforilación de la subunidad p85 de la PI3K que posteriormente activa la proteína Akt. Esta proteína, por su parte, provoca la fosforilación y activación de mTOR, inhibiendo la autofagia (37,57,147). La irradiación produce una disminución de la fosforilación y de la autofosforilación de mTOR, lo que conduce a una inducción del proceso autofágico (37,57,168). Múltiples estudios han demostrado el efecto positivo del inhibidor mTOR en la radiosensibilización.

#### 1.6.1.7.2. ROS y autofagia

La exposición a radiación ionizante genera un estrés celular en el que se produce una gran generación de ROS y RNS. Estas moléculas inestables se acumulan en la mitocondria, el RE y en otras partes de la célula, como el núcleo, generando un daño macromolecular en

estas regiones celulares. Para solventar este daño, se inducen múltiples vías que regulan la autofagia como la de AMPK, UPR o la de MAPK/ERK que se activan ante un estímulo estresante y permiten la activación de otras quinasas y factores de transcripción, así como la expresión de HIF-1 $\alpha$  (37,57,175–177,127,141,169–174). Estas vías conducen a (37,57,127,177): a) oxidación de ATG4 permitiendo la acumulación de autofagosomas; b) activación de la cascada de señalización de AMPK lo cual inicia la autofagia mediante el complejo ULK1; c) alteración de la interacción BECN1-BCL-2 que da lugar a la inducción de la autofagia; o d) alteración del equilibrio de la mitocondria dando paso a la mitofagia.

Una de las principales vías por las que ROS induce daño y, por tanto, activa la autofagia es por su acumulación en la mitocondria. Este orgánulo celular es esencial en la generación de energía (ATP). La acumulación de ROS en su interior genera modificaciones biológicas y una pérdida del equilibrio energético (57,146,147,178,179). Como consecuencia, el ratio AMP/ATP aumenta y se activa AMPK, cuya forma activa fosforilada induce el proceso de la autofagia para restablecer el equilibrio energético (37,57,146). AMPK actúa a distintos niveles: a) inhibiendo la actividad de mTOR (fosforilándolo), b) fosforilando ULK1, c) fosforilando Beclin-1 y PI3KC3 y d) inhibiendo la interacción de Beclin-1 con Bcl-2. Asimismo, la acumulación de ROS en la mitocondria y el daño generado en este orgánulo puede inducir mitofagia. La mitofagia es un proceso de autofagia selectivo de la mitocondria en respuesta a estímulos extremos como la escasez de nutrientes, estrés oxidativo o alteraciones en las proteínas mitocondriales (146). La mitofagia está controlada por dos vías diferentes: BNIP3/NIX y Parkin (PARK2)/PINK1 (49,57,146). La primera regula la agregación del contenido dañado directamente a los autofagosomas interaccionando con el receptor asociado a GABA, un homólogo de LC3; la segunda se une a BCL2 y permite la autofagia (57,127,146,180). Parkin es capaz de detectar cambios en la polarización de la mitocondria y, una vez activado, participa en la ubiquitinización del canal VDAC1 que reconoce a p62 y, por tanto, con LC3 del autofagosoma (57,146,155,177,181).

Por otro lado, la acumulación de ROS tras la irradiación también produce un estrés en el RE y con ello un aumento en la respuesta a proteínas UPR. Así pues, tras la irradiación, el aumento de ROS activa sensores en la membrana del RE que elevan los niveles de HSPA5 (182,183) (37,57,147,184), PERK-eIF2a (proteína quinasa del retículo

endoplasmático-factor de iniciación eucariota 2 $\alpha$ ), IRE1a (*Inositol-Requiring Enzyme 1*) y ATF6 (37,57,141). En condiciones normales, estos tres componentes son inhibidos por la unión con la chaperona GRP78. Sin embargo, cuando aumentan los niveles de las proteínas UPR, esta chaperona se une a estas proteínas mal plegadas dejándolos libres y, por tanto, activos. En su forma activa pueden regular la transcripción de distintos genes *ATG* y, por tanto, la autofagia. En concreto, PERK puede inducir el proceso de autofagia inhibiendo directamente mTOR o indirectamente a través de PARP1 (57). IRE1a, por su parte, pertenece a la ruta de JNK y, al activarse, provoca la fosforilación de Bcl-2, liberándose así Beclin-1, activa el complejo PI3K, así como la inducción de p53 y Atg5, y da paso al proceso autofágico (37,141,146).

Por último, se ha descrito que la generación de ROS activa la vía de MAPK/ERK, en la que se incluyen las quinasas JNK y ERK, y cuya activación ante estímulos estresantes resulta clave en la inducción de autofagia (37,57). La activación de JNK potencia la muerte celular induciendo p53 y Atg5, así como que inhibe la asociación de Bcl-2 con Beclin-1 y regula al alza Beclin-1 (37). Por otro lado, la inhibición de JNK puede inhibir la expresión de Beclin-1 y, por tanto, la autofagia (37).

Una de las vías por las que las células tumorales son capaces de adaptarse al estrés oxidativo secundario a la radiación ionizante mediante diversos mecanismos es la respuesta hipóxica. La RT puede alterar la vascularización del tumor, inducir una situación de hipoxia y activar HIF-1 $\alpha$ . De esta manera, si se consiguen niveles bajos de oxígeno, se reduce la producción intratumoral de ROS (141). Cuando la expresión de HIF-1 $\alpha$  aumenta, se transloca al núcleo donde se une a los elementos de respuesta a hipoxia e induce la autofagia por distintos mecanismos entre los que se incluye una regulación de la expresión de genes como *BNIP3* (57,141). BNIP3 favorecerá la liberación de Beclin-1 del complejo que forma con Bcl-2 y se inducirá la autofagia (57). Además, HIF-1 $\alpha$  permite a las células tumorales: a) activar la glicólisis e inhibir la fosforilación oxidativa mitocondrial gracias a la regulación al alza la quinasa piruvato deshidrogenasa 1 (PDK1), que suprime la generación de ROS respiratoria; b) inducir la expresión de agentes antioxidantes y disminuyen el daño secundario a ROS (141). Por tanto, HIF-1 $\alpha$  confiere a las células tumorales protección a la RT contribuyendo a un estadio de radorresistencia, de modo que se trata de una diana interesante para mejorar los resultados de la radiación ionizante (141).

La acumulación de ROS y RNS también produce un daño en el núcleo. A diferencia de otros componentes de la célula, el ADN no puede someterse a un proceso de autofagia, ya que no se puede destruir, sintetizar de nuevo o reemplazar (146). No obstante, hay un proceso poco común que consiste en la degradación del ADN nuclear llamado *piecemeal* microautofagia del núcleo (146,185). Esta tiene lugar a partir de las uniones entre vacuolas del citoplasma y el propio núcleo, de manera que engloban el contenido a degradar formando una vesícula que es degradada por hidrolasas (146,186).

#### 1.6.1.7.3. Ceramida y autofagia

La irradiación produce una activación de las glucosidrolasas que hay en las membranas celulares que a su vez son fundamentales en la producción de ceramida de la membrana plasmática, activadas por el daño de RCD. Las ceramidas regulan múltiples vías, entre ellas la autofagia (57,141,187–189).

Las ceramidas actúan en condiciones de escasez de nutrientes disminuyendo la expresión de  $\alpha$  y transportadores de nutrientes, de modo que reducen la vía de señalización de mTOR y activan AMPK, induciendo, por tanto, la autofagia (57,190–192). Además, activan la quinasa JNK y, por tanto, aumentan la expresión de BECN1 (57).

Por otro lado, la acumulación de ceramidas también produce un estrés en el RE que conlleva la activación de la autofagia y en la mitocondria induciendo la mitofagia (57,193,194).

#### 1.6.1.7.4. Calcio iónico y autofagia

Entre los múltiples efectos que se producen tras la radiación ionizante a nivel celular está la entrada de calcio a la célula (147,195). Los mecanismos por los que la RT controla la concentración de calcio intracelular son varios: a) la acumulación de ceramidas que controlan la entrada a través de un canal de membrana; b) la activación de la enzima PLC localizada en la membrana plasmática y que produce IP3, lo que induce la salida del calcio del RE (57,196). Este calcio es capaz de inducir la autofagia, induciendo LC3 citoplasmático (57). Además, puede activar el AMPK que inducen la autofagia también (57).

## 1.6.2. AGENTES QUIMIOTERÁPICOS

A día de hoy existen múltiples estrategias terapéuticas, desde tratamientos locales con cirugía y RT, hasta tratamientos sistémicos con la quimioterapia, la terapia dirigida y la inmunoterapia. En la actualidad se están buscando combinaciones de distintas estrategias terapéuticas que permitan mejorar los resultados frente al cáncer reduciendo efectos secundarios. Uno de los puntos en los que se está trabajando es la modulación de la autofagia o el uso de moduladores epigenéticos. En esta línea, a continuación, se describen los inhibidores de las proteínas histona deacetilasas como inductores de la autofagia y la cloroquina como inhibidor de la misma.

### 1.6.2.1. PROTEÍNAS HDAC COMO POSIBLES DIANAS TERAPÉUTICAS Y PANOBINOSTAT®

#### 1.6.2.1.1. Epigenética

Los cambios epigenéticos son aquellos que alteran la expresión génica sin modificar la secuencia de nucleótidos del ADN (197–202). En general, hay dos formas principales de cambios epigenéticos: aquellos que modifican directamente el ADN, como es la metilación de ADN, o aquellos que modifican la unión de ADN a diversas proteínas, como por ejemplo las histonas.

Las histonas son proteínas con un núcleo con múltiples subunidades (dos copias de H2A, H2B, H3 y H4) que envuelve al ADN y forma un nucleosoma (29,197,198,202–204). Esto es fundamental para que el ADN se organice en cromosomas. Las histonas pueden sufrir múltiples modificaciones: metilación, acetilación, fosforilación...

Teniendo en cuenta que los cambios en la acetilación de histonas y que la expresión aberrante de histonas deacetilasas (HDACs) son frecuentes en diversos procesos malignos (197,205), la inhibición de HDACs podría suponer una estrategia terapéutica frente al cáncer. Los inhibidores de HDAC (HDACi) se han desarrollado rápidamente en los

últimos años para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos, tanto en monoterapia como en combinación con otros fármacos.

#### 1.6.2.1.2. Acetilación de las histonas

Las modificaciones de la histona alteran la afinidad de estas proteínas por el ADN y estas modificaciones afectan a la transcripción.

- **Metilación y desmetilación de histonas.** Se añaden grupos metilo (CH<sub>3</sub>) a uno o varios aminoácidos lisina de la histona. Las enzimas que catalizan esta metilación son las histonas metiltransferasas; las enzimas que quitan los grupos metilo son las histonas desmetilasas (197,198,200,202).
- **Acetilación y deacetilación de histonas.** La acetilación es la adición de un grupo acetilo (CH<sub>3</sub>CO) a las lisinas de la histona, de modo que neutraliza la carga positiva y disminuye la afinidad entre la histona y el ADN, lo que produce una relajación de la cromatina y facilita la transcripción génica (128,197,208,209,198,199,201–204,206,207). Las enzimas que catalizan este proceso son las histonas acetiltransferasas (HATs) junto al cofactor acetil-CoA. Las enzimas que retiran el grupo acetilo de la histona son las histonas deacetilasas (HDACs). Es decir, la acetilación se asocia con una activación génica, mientras que la deacetilación disminuye la expresión génica. De esta forma, las HATs permiten una forma de cromatina abierta, llamada eucromatina, mientras que las HDACs permiten la condensación de la cromatina, la heterocromatina, ya que aumentan la carga positiva de las histonas que reaccionan con la carga negativa del ADN y bloquean la transcripción. Para ello, las HDACs trabajan de forma conjunta con coactivadores, correpresores, factores de transcripción y HATs.

El balance entre ambos tipos interviene mediante múltiples vías en el proceso tumoral (197–202,204,207,208,210). En la Figura 17 se muestra la interacción entre HATs y HDACs, y las vías en las que participan.

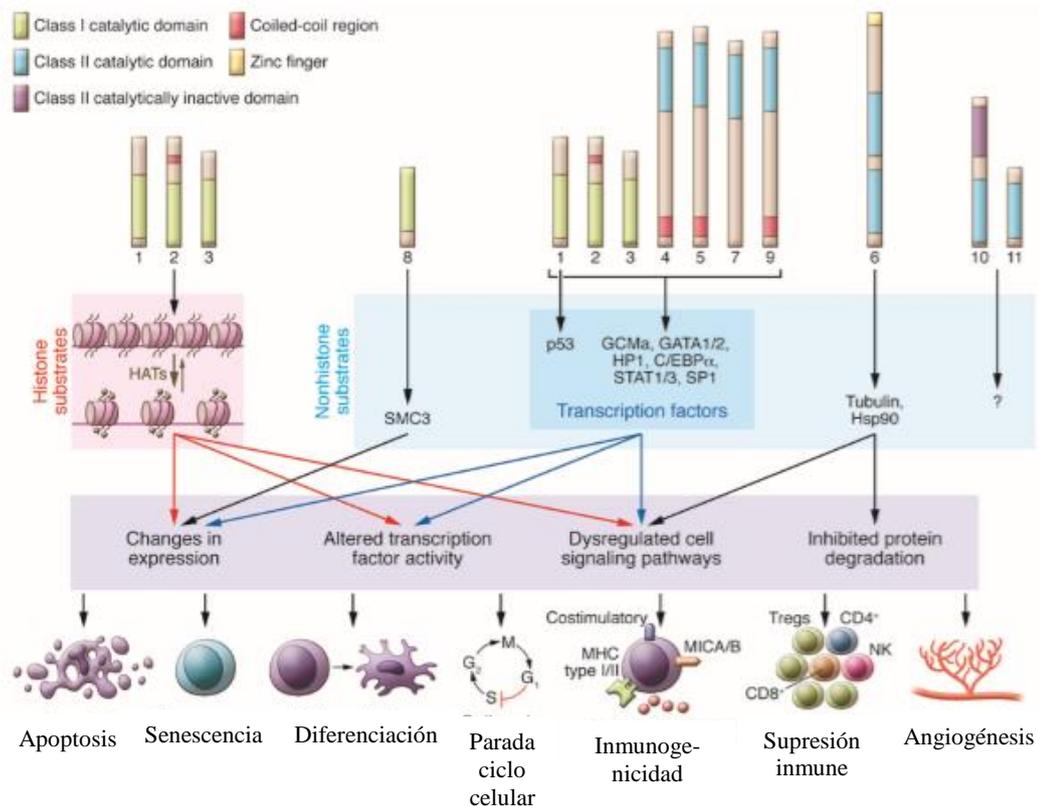


Figura 17. Esquema modificada de West y Johnstone (197). Vías en las que participan las HDACs.

Las HDACs tienen su papel fundamental a nivel de las histonas, pero también actúan a nivel de proteínas no histonas, modificando múltiples funciones celulares, como la apoptosis, el transporte y la integridad del ARNm, la traducción, la interacción entre proteínas, así como diversos pasos del sistema inmune (128,197–201,207,211).

Hay un total de 18 HDACs que se clasifican en cuatro clases: I, II, III y IV, de acuerdo con la similitud a las proteínas de levadura, localización subcelular y actividad enzimática (128,197–199,202,203,207–209,211). En la Tabla 3 se resume los tipos de HDAC y su mecanismo de acción.

Se ha demostrado que existe una correlación entre la sobreexpresión de HDAC en distintos tumores (Tabla 3) y la disminución de supervivencia global y libre de enfermedad, siendo capaz de predecir mal pronóstico independientemente de otras variables como el tipo de tumor o progresión (197,207). Además, la sobreexpresión de HDACs se ha relacionado con eventos clave de la tumorigénesis como la represión epigenética del gen supresor de tumores *CDKN1A* (*encoding the cyclin-dependent kinase*

*inhibitor p21waf1/cip1*) y genes como *TP53*, *BRCA1* o *ATR* (197). No obstante, no siempre la sobreexpresión de HDAC es un factor de mal pronóstico. La elevación de HDAC6 se relaciona con un mejor pronóstico en el cáncer de mama con receptores de estrógeno positivos y en el linfoma cutáneo de célula T (197).

Tabla 3. Resumen de las HDAC. Se detallan los subtipos, mecanismos de acción y funciones, proteínas diana y su expresión en los diferentes tipos de cáncer. CTCL: linfoma cutáneo de célula T. LH: linfoma Hodgkin. LLA: leucemia linfoblástica aguda. (128,197–199,202,203,207–209,211).

HDAC clase (localización)	HDAC subtipo	Mecanismo de acción	Función	Proteína diana	Expresión en cáncer
I (núcleo)	HDAC 1	Dependiente de Zn <sup>++</sup>	Proliferación y supervivencia celular	Histonas, pRb, SHP, BRCA1, MECP2, ATM, MEF2, MyoD, p53, NF-κB, AR, DNMT1	↑ estómago, mama, colorrectal, pulmón, hígado, próstata, LH.
	HDAC 2		Proliferación celular y resistencia a insulina	Histonas, BRCA1, NF-κB, MECP, GATA 2, pRb	↑ estómago, colorrectal, próstata, cérvix, pulmón, LH, CTCL
	HDAC 3		Proliferación y supervivencia celular	Histonas, HDAC (4, 5, 7, 9), GATA 1, NF-κB, pRb	↑ estómago, mama, colorrectal, hígado, LH, LLA. ↓ hígado
	HDAC 8		Proliferación celular	HSP70	↑ neuroblastoma
IIA (citoplasma y núcleo)	HDAC 4	Dependiente de Zn <sup>++</sup>	Regulación de citoesqueleto y movilidad celular	Histonas, HDAC 3, 14-3-3, CaM, MEF2	
	HDAC 5		Funciones endoteliales, gluconeogénesis, crecimiento y funciones de cardiomiocitos		↑ meduloblastoma, hígado. ↓ pulmón.
	HDAC 7		Funciones endoteliales y gluconeogénesis		↑ LLA. ↓ pulmón

	HDAC 9		Diferenciación timocitos, recombinación homóloga, funciones de células cardiacas		↑ meduloblastoma, LLA.
IIB (citoplasma y núcleo)	HDAC 6	Dependiente de Zn <sup>++</sup>	Regulación de citoesqueleto y movilidad celular	HDAC 11, SHP, HSP 90, α tubulin	↑ mama, CTCL. ↓ pulmón
	HDAC 10		Regulación autofagia y recombinación homóloga	LcoR, PP1	
III (núcleo, citoplasma y mitocondria)	SIRT 1	Dependiente de NAD <sup>+</sup>	Autoinmunidad, edad, equilibrio redox, supervivencia celular	Histonas, NF-κB, p53, p300	
	SIRT 2		Supervivencia, migración, invasión celular	Histone H4, PPAR-γ, p53, p300, α-tubulin, FOXO	
	SIRT 3		Regulación de ATP, señalización celular, ciclo urea	Complejo I ETC, PGC-1α, p53, Ku70, sintetasa acetyl-CoA, FOXO	
	SIRT 4		Metabolismo energético, ciclo urea, señalización celular	Glutamato deshidrogenasa	
	SIRT 5		Regulación ATP, señalización celular, apoptosis, ciclo de urea	Fosfato sintetasa carbamoyl I, citocromo c	
	SIRT 6		Regulación metabolismo	Histona H3, TNF-α	
	SIRT 7		Apoptosis	p53, ARN polimerasa I	
IV (núcleo)	HDAC 11	Dependiente de Zn <sup>++</sup>	Replicación ADN, inmunomodulación	HDAC 6	Elevado en cáncer de mama, riñón, hígado

### 1.6.2.1.3. Inhibidores HDAC (HDACi)

Los inhibidores de HDAC (HDACi) actúan típicamente sobre las HDAC clase I, II y IV. Al inhibir las HDACs, aumentan los niveles de acetilación de las histonas, lo que se traduce en una reexpresión de genes reguladores que estaban silenciados en las células cancerosas (198). Estos compuestos han mostrado actuar más sobre las células tumorales que en las normales, lo que supone una ventaja terapéutica en cuanto a efecto citotóxico y a toxicidad (197,198,200).

#### 1.6.2.1.3.1. Mecanismo de acción de los HDACi

El efecto antitumoral de los HDACi no se debe a un único mecanismo, si no a la combinación de varios (Figura 18) (197–200,203,208):

- **Inducción de la apoptosis de forma selectiva** en las células tumorales mediante la regulación de genes y proteínas pro- y antiapoptóticas, que activan vías intrínsecas y extrínsecas (197–200,203,211).

Hay una asociación entre los genes relacionados con la expresión e inducción de la apoptosis, y la hiperacetilación de histonas en genes promotores de la apoptosis como *TNFSF10* (*encoding TRAIL*) y *BMF* (*encoding the proapoptotic Bcl-2 family member Bmf*) (197), así como cambios en la actividad de factores de transcripción debido a la acetilación, como la inhibición de SP1 y C/EBP $\alpha$ , permitiendo la regulación a la baja de las proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (197,207).

- **Parada del ciclo celular y senescencia** (197,198,200). Los HDACi pueden parar el ciclo celular en las fases G1/S, y G2/M. Uno de los mecanismos más importantes es la elevación de los niveles de los inhibidores de CDKs y la disminución de la actividad de las CDK, y a su vez produce la desfosforilación de Rb y la inhibición del gen transcripcional E2F para la progresión de G1 a S en el ciclo celular (198,200,208).

La concentración de los HDACi influye, ya que a dosis más bajas se induce la parada en G1, mientras que a dosis mayores se produce tanto en G1 como G2/M (198,208). En ciertas circunstancias, la pérdida del punto de control de la fase G2 puede llevar a una muerte apoptótica en presencia de los HDACi. Las células que no tienen defectos en el punto de control G2 son resistentes a los HDACi.

- **Autofagia.** La inactivación de la vía PI3K-Akt-mTOR es la forma más descrita como mecanismos de acción de los HDACi respecto a la autofagia (211). Las proteínas HATs y HDACs regulan la acetilación de muchas proteínas relacionadas con la autofagia, como la de los ATGs, LC3, Beclin-1, y de otros factores como FOXO (199,200,211).

El papel de los HDACi en el proceso de autofagia se ha descrito en distintas líneas celulares, como se muestra en la tabla 4 a través de diversos mecanismos (198–200,211–213).

La posibilidad de que los HDACi puedan inducir la muerte de aquellas células tumorales resistentes a la apoptosis mediante la autofagia supondría un gran impacto en la práctica clínica. De cualquier forma y como ya se ha comentado, no existe un mecanismo único ni los HDAC inducen la autofagia por una sola vía.

Tabla 4. Modificada de Mrakovcic (211).

HDAC diana	Mecanismo molecular	HDACi	Línea celular
HDAC 1		FK228; HDAC1 siRNA	HeLa
HDAC1/HDAC2	Autofagia <i>phenylephrine-triggered</i>	TSA; ATG5/BECN1 RNAi	Cardiomiocitos
HDAC6	Control de la fusión autofagosoma con el lisosoma, daño en mitocondria	Tubacin; HDAC6 siRNA	MEF
HDAC7	Activación reducida de ERK	HDAC7 siRNA	MEC

- **Inhibición de la angiogénesis.** En situaciones de hipoxia, Kim *et al.* demostraron que las células tumorales in vitro presentan sobreexpresión de HDAC1, -2 y -3, así como una disminución de la expresión de la proteína von Hippel-Lindau y p53. Por tanto, esto conduce a un aumento de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y VEGF. Varios HDACi inhiben la angiogénesis regulando HIF-1 $\alpha$  ya sea por mecanismos directos o indirectos (198,199,206–208). Los puntos en los que pueden actuar los HDACi además de en HIF-1 $\alpha$  y VEGF, son la regulación a la baja de la angiopietina, TIE2 y eNOS o la regulación al alza de p53, VHL, tromboespondina 1 y la transcripción de la activina A antiangiogénica. (206).

- **ROS.** Los HDACi conducen a la acumulación de ROS dentro de las células, lo cual conduce a la muerte celular por apoptosis y el daño en el ADN que regula al alza las proteínas proapoptóticas que promueven la vía intrínseca (198,200,201,208). El mecanismo por el que se produce la acumulación no está bien establecido pero parece que la acumulación de ROS se relaciona con que en las células tumorales no presentan la proteína antioxidante tiorredoxina que compensa el estrés oxidativo (200).
- **Muerte celular por catástrofe mitótica.** Los HDACi producen una acetilación anormal en la histona que interfiere con la actividad mitótica, de modo que se produce una parada en la prometafase seguido de una mitosis anormal que conduce a la muerte celular mitótica o apoptosis (198).
- **Interferencia con la reparación del ADN dañado** (199,200,208). La delección o inhibición de HDAC9 y HDAC10 afecta al proceso de la recombinación homóloga (200). La inhibición de la HDAC6 inhibe la capacidad de reparación de la célula (200).
- **Sistema inmune** (199,200). Estos fármacos y la consecuente disminución de la actividad de las HDACs aumentan la inmunogenicidad de las células tumorales, de modo que favorecen la presentación de antígenos y la coestimulación de moléculas en la superficie de las células tumorales como la calreticulina, así como la regulación al alza del CMH clase I y II, y de las células *natural killer* (CNK) (199,200,214,215). Este aumento de la inmunogenicidad se traduce en un aumento de la activación de los linfocitos T (215,216).
- **Efecto antimetastásico.** Los HDACi incrementan la expresión de genes que actúan como supresores de metástasis (*Kangai (KAI1)*, *Ras homologs*, *RhoB*, *RECK* y *TIMP-1*) y disminuyen aquellos promotores de metástasis (metaloproteinasas (MMPs), integrina- $\alpha 5$  y formas de colágeno) (197,211).

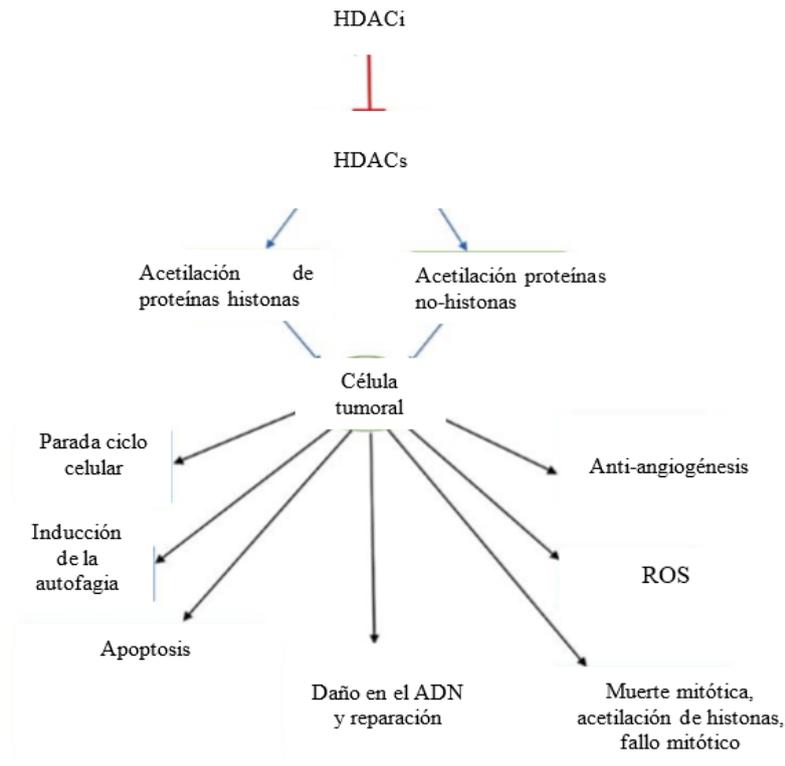


Figura 18. Esquema modificado de Singh *et al.* (198). Vías en las que interviene HDACi.

#### 1.6.2.1.3.2. Tipos de HDACi

Los HDACi se clasifican en grupos según su estructura química: ácidos hidroxámicos, tetrapéptidos cíclicos, benzamidas, cetonas electrofílicas, y ácidos alifáticos (128,197,199,200,202,203,208,210). Estos agente pueden actuar frente a todas las HDAC (pan-inhibidores) o frente a un tipo específico (HDACi selectivos) (199,200,208).

#### 1.6.2.1.4. Ácidos hidroxámicos

Los ácidos hidroxámicos se unen a los iones de zinc que necesitan las HDACs para su actividad catalítica (199–203,208,210). Dentro de este grupo se incluyen: tricostatina A (TSA), vorinostat (SAHA), panobinostat® (LBH589), GIVINOSTAT (ITF2357), belinostat (PDX101), resminostat (4SC-201), PCI 24781 y CXD101. En general, presentan una buena tolerancia en clínica (202,208,210).

Son múltiples los estudios con diversas líneas celulares (Tabla 5). A nivel clínico, los HDACi aprobados por la FDA son vorinostat, romidepsin, belinostat y panobinostat®

para el tratamiento de diversos tumores (Tabla 6) (197,198,201). En los últimos años se han desarrollado y estudiado nuevos compuestos como givinostat (ITF2357), mocetinostat (MGCD01030), pracinostat (SB939) y entinostat (MS275). A nivel preclínico, algunos han demostrado mayor efecto que vorinostat y romidepsin, en cambio no han demostrado mejor perfil de toxicidad ni novedades respecto al mecanismo de acción.

Tabla 5. Ensayos con líneas celulares de varios HDACi. CTCL: linfoma cutáneo de célula T. MM: mieloma múltiple. LB: linfoma de Burkitt. LH: linfoma Hodgkin. PTCL: linfoma célula T periférico. LT: linfoma célula T. Resaltado en gris el fármaco utilizado en este trabajo.

Fármaco	Grupo HDACi	Estudios en diversas líneas celulares	Diana
<b>Vorinostat (SAHA)</b>	Ácido hidroxámico	CTCL Otros: cerebrales, colorrectal refractario, melanomas, pancreáticos, pulmón, MM, PTCL	Pan-inhibidor (I, II, IV)
<b>Belinostat (PXD101)</b>	Ácido hidroxámico	MM, LB, tumores ginecológicos	Pan-inhibidor (I, II, IV)
<b>Panobinostat® (LBH589)</b>	Ácido hidroxámico	MM Otros: CTCL, AML, LH, MDS, tiroides, colorectal y próstata	Pan-inhibidor (I, II, IV)
<b>Tricostatin A (TSA)</b>	Ácido hidroxámico	Diversas líneas celulares. No indicaciones clínicas por toxicidad	Pan-inhibidor (I, II, IV)

Tabla 6. Modificada de Garmpi *et al.* (2008). Fármacos HDACi aprobados para la práctica clínica por la FDA. CTCL: linfoma cutáneo de célula T. MM; mieloma múltiple. Resaltado en gris el fármaco utilizado en este trabajo.

Nombre comercial	Nombre químico	Año aprobado por la FDA	Clasificación	Indicación
<b>Zolinza</b>	Vorinostat	2006	Ácido hidroxámico	CTCL
<b>Beleodaq</b>	Belinostat	2014	Ácido hidroxámico	CTCL
<b>Farydak</b>	Panobinostat®	2015	Ácido hidroxámico	MM

Respecto al panobinostat® o LBH589 (Figura 19), este inhibidor actúa a dosis nanomolares a nivel de todas las HDAC de modo que es un HDAC pan-inhibidor, además de actuar a nivel de proteínas no histonas (128,198,199,201,208,217). Se ha visto que su efecto es considerablemente mayor al alcanzado por el vorinostat. Este fármaco produce

una hiperacetilación de la  $\alpha$ -tubulina e inhibe a HDAC6, de modo que provoca una alteración del transporte de las UPR para su degradación en el autofagolisosoma, induciendo apoptosis (218). Por otro lado, se ha visto que la combinación de éste con otros fármacos, como corticoesteroides u otros agentes inmunomoduladores (talidomida o lenalidomida) puede potenciar el efecto antitumoral de estos últimos (219).

En diversos estudios se ha comprobado su papel en la apoptosis, angiogénesis e inmunidad como tratamiento antitumoral, mostrando especificidad por las células tumorales. Ha sido ampliamente estudiado en el linfoma cutáneo de célula T (CTCL), demostrando eficacia en ensayos clínicos fase I y II. Se probó por primera vez en el tratamiento del cáncer de páncreas *in vitro* en 2008 por el grupo de Haefner *et al.*, demostrando que el panobinostat® produce la interrupción el paso de G2/M, la apoptosis y la regulación al alza de p21 (220). En condiciones *in vivo*, este fármaco reduce significativamente la masa del tumor, pero no se ha visto que aumente de manera significativa la apoptosis ni reduzca la proliferación celular (208,220). Hay estudios fase II para valorar la eficacia del panobinostat® en combinación con bortezomib, de hecho, es la indicación aprobada para el tratamiento del mieloma múltiple (Tabla 5). Por otro lado, se trata de un fármaco que se ha combinado con otros para valorar efecto sinérgico, entre ellos la dexametasona, lenalidomida o vorinostat (201).

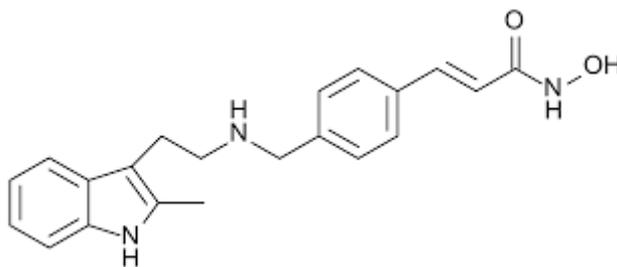


Figura 19. Fórmula química del panobinostat®. La molécula tiene un grupo *indol* metilado en la posición 2 y 3, y unido a un grupo *fenilo* a través de una amina secundaria. El *fenol* contiene un grupo *acrilamida*, en el carbono *para*, modificada en el nitrógeno por un grupo *hidroxilo*.

Como cualquier fármaco, en los ensayos clínicos con los HDACi se han observado efectos secundarios, desde leves (diarrea, anorexia o deshidratación) hasta severos (mielosupresión, trombocitopenia, cardiotoxicidad) (200,203,208,211). Los efectos asociados más frecuentemente al panobinostat® son la diarrea y la cardiotoxicidad (198).

El efecto de los HDACi se puede ver potenciado por su combinación con otros fármacos y RT (199,200,203,206,211). Son múltiples los experimentos con diversos quimioterápicos, como gemcitabina, paclitaxel, cisplatino, etoposido, doxorubicina y epirubicina; agentes desmetilantes, como azacitidina y decitabina, agonistas del receptor anti-TRAIL. Por otro lado, diversos HDACi, como TSA, butirato, vorinostat o CI-994, han demostrado ser radiosensibilizantes en diversas líneas celulares (201).

#### 1.6.2.2.CLOROQUINA

El uso principal de la cloroquina (CQ) es como antimalárico, pero también se ha utilizado en enfermedades inflamatorias por su efecto inmunosupresor, incluso hay estudios de su papel como antiretroviral en pacientes HIV-1/AIDS (41,42,56,221,222). Los estudios más recientes señalan el efecto antitumoral como inhibidor de la autofagia tanto de la CQ como de su derivado la hidroxiclороquina (41,56,222,223).

La CQ puede existir como forma cargada (protonada) y no cargada (no protonada) (Figura 20). La forma no protonada puede pasar libre y rápidamente por la membrana de células y orgánulos (42,56,224).

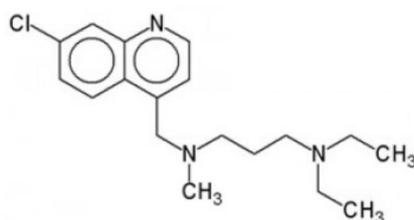


Figura 20. Fórmula química de la CQ: (RS)-N-(7-cloroquinolin-4-il)-N,N-dietil-pentano-1,4-diamina.

Respecto a su papel en el proceso de la autofagia, la forma no protonada de CQ es capaz de pasar al interior de vesículas y lisosomas libremente, el medio más ácido de su interior, hace que se protona, impidiendo que pueda atravesar la membrana nuevamente, de modo que queda atrapada dentro de los lisosomas, acumulándose en los mismos y alterando su funcionalidad (42,56,222,224,225): asimismo actúa en la inhibición de las enzimas fosfolipasa A2, lisofosfolípido acilhidrolasa, y monoacilglicerol lipasa (42,56,95,224). Además, la CQ bloquea de la fusión de los autofagosomas con los lisosomas, impidiendo la formación del autolisosoma y, por tanto, no tiene lugar la degradación de su contenido (41,42,56,226).

La acumulación de CQ en el interior de las vesículas hace que se produzca una elevación del pH dentro de las vesículas, de modo que aumenta el volumen de los lisosomas y la superficie de su membrana (56,222,224). El aumento de volumen induce factores intrínsecos y extrínsecos que pueden cambiar el tipo de muerte celular de apoptosis a necrosis (224).

Por otro lado, la acumulación de CQ dentro de los lisosomas aumenta la permeabilidad de su membrana, de modo que se inicia la degradación mitocondrial mediante apoptosis (225). Este aumento de permeabilidad también produce la secreción de proteasas como la catepsina B que puede desestabilizar la membrana celular (224).

Las dosis utilizadas varían entre 100 y 500 mg/día (56). A dosis bajas, apenas se dan efectos secundarios; si se emplean dosis más altas, pueden aparecer alteraciones visuales, gastrointestinales, cardíacas, cutáneas... (56).

Como tratamiento antitumoral, hay múltiples estudios del papel de la CQ en varias entidades tumorales, así como las ventajas de su combinación con otros tratamientos aumentando la sensibilidad de las células tumorales a los mismos, ya sean quimioterápicos o RT (42,56,95,222,224–229). Respecto a la combinación con RT, son múltiples las revisiones que confirman el poder radiosensibilizante de la CQ (42,95,99,224,225,227,229–232). De los datos obtenidos, parece que la potenciación de la CQ sobre la RT se debe al impacto negativo que produce el fármaco sobre el proceso de recuperación tras la irradiación.

Además del efecto directo de la CQ en las células tumorales, también se ha descrito que este fármaco actúa a nivel del microambiente tumoral. Tanto la CQ como su derivado, la hidroxiclороquina, pueden potenciar el sistema inmune o actuar a nivel de la vasculatura tumoral (223).



## ***2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***

En los últimos años se ha profundizado en el papel dual de la autofagia en el desarrollo y el mantenimiento del cáncer. En este sentido, se han estudiado diversos agentes que actúan como modificadores de la autofagia con el objetivo de obtener un beneficio terapéutico.

El papel de la radioterapia como arma terapéutica en el tratamiento de enfermedades tumorales malignas está bien establecido, experimentando una gran revolución en los últimos años gracias a los avances tecnológicos en cuanto a las pruebas de imagen y a la administración de la radiación ionizante.

Cada vez somos más conscientes de la necesidad de un enfoque multidisciplinar en el tratamiento del cáncer. De ahí que surjan líneas de investigación que analicen el beneficio de la combinación de los diferentes tipos de tratamiento a nuestro alcance. Hasta ahora, los estudios preclínicos y clínicos que analizan el tratamiento combinado de radioterapia junto a moduladores de la autofagia no aportan resultados concluyentes, de ahí el creciente interés en la profundización de este tema.

En nuestro trabajo, nos planteamos la siguiente **hipótesis**: la combinación de radioterapia junto a modificadores de autofagia, un inductor y un inhibidor, permitiría disminuir la dosis de radiación ionizante administrada manteniendo el mismo efecto. Para ello, nuestros **objetivos** son los siguientes:

- Valorar la respuesta en varias líneas celulares al tratamiento de radioterapia y dos moduladores de la autofagia, cloroquina (inhibidor) y panobinostat (inductor), en monoterapia, así como analizar el porcentaje de muerte celular a dosis crecientes de los mismos.
- Estudiar la respuesta en varias líneas celulares al tratamiento combinado de radioterapia con cloroquina, y radioterapia con panobinostat, así como analizar el porcentaje de muerte celular a dosis crecientes combinadas y si el efecto conseguido por estas combinaciones es mayor que en radioterapia en monoterapia.
- Valorar si el efecto alcanzado en la combinación es sinérgico.
- Analizar la inducción o inhibición de la autofagia mediante la expresión de proteínas relacionados con este proceso tras la administración de radiación

ionizante y ambos agentes modificadores de la misma cuando su tratamiento combinado alcance efecto sinérgico.



### ***3. MATERIAL Y MÉTODOS***

### 3.1. Líneas celulares

Se trabajó con las siguientes líneas celulares correspondientes a cáncer de mama (MDA-MB-231 y HCC-1937), cáncer de próstata (VCAP) y cáncer de cabeza y cuello (CAL33 y 32860). Todas ellas detalladas en la siguiente tabla (Tabla 7).

Tabla 7. Características de las líneas celulares empleadas.

LÍNEA CELULAR	HISTOLOGÍA. LOCALIZACIÓN. ESTADIO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
MDA-MB-231	Adenocarcinoma epitelial de mama	Línea aneuploide con un cariotipo próximo a la triploidia. <i>BRCA1 wild-type</i> . Mutación <i>p53</i> y <i>KRAS</i> . Deleción <i>CDKN2A</i> .	ATCC, Rockville, MD
HCC-1937	Carcinoma ductal infiltrante de mama	Triple negativo. Mutación <i>BRCA1</i> , <i>p53</i> , <i>RBI</i> y <i>PTEN</i> .	ATCC, Rockville, MD
CAL33	Carcinoma escamoso moderadamente diferenciado de cavidad oral	Cariotipo: cercano a la tetraploidia Pérdidas en los cromosomas 5 (5p/q) y 21 (21q21) y ganancia en el cromosoma 13 (13q) Mutación <i>p53</i> y <i>pArg175His(c.524 G&gt;A)</i> .	ATCC, Rockville, MD
32860	Carcinoma escamoso pobremente diferenciado de laringe (supraglotis)	Cariotipo: hiperploidia moderada	Biopsia quirúrgica
VCAP	Cáncer epitelial de próstata. Estadio metastásico	Mutación <i>p53</i> , <i>MLH1</i> y <i>TMPRSS2-ERG</i> .	ATCC, Rockville, MD

#### 3.1.1. MDA-MB-231

La línea celular MDA-MB-231 (Figura 21.A) se corresponde con una línea celular derivada de un tumor de mama de tipo adenocarcinoma metastásico TNM IV de una mujer de 51 años (*Homo sapiens*) con receptores hormonales negativos. Se trata de una línea aneuploide con un cariotipo en el que las células suelen ser triploides. Las alteraciones moleculares de esta línea son mutación *p53*, *KRAS* y deleción *CDKN2A*. Respecto al gen *BRCA1* es *wild-type*, es decir, no presenta alteraciones moleculares en el mismo.

### 3.1.2. HCC-1937

La línea celular HCC-1937 (Figura 21.B) se corresponde con una línea celular derivada de una mujer (*Homo sapiens*) de 23 años con cáncer de mama de tipo carcinoma epitelial ductal infiltrante de mama grado 3 estadio TNM IIB. Se trata de una línea que no presenta receptores hormonales ni expresión de HER2. Asimismo, se caracteriza por presentar las siguientes alteraciones moleculares: mutaciones en p53, *BRCA1*, *RB1* y *PTEN*.

### 3.1.3. CAL33

La línea celular CAL33 (Figura 21.C) fue derivada de un tumor de estirpe carcinoma escamoso moderadamente diferenciado y localizado en lengua en un varón de 69 años de la especie *Homo sapiens*. Se desconoce el estadio y VPH. Las alteraciones moleculares presentes en esta línea son p53 mutado y pArg175His(c.524 G>A).

### 3.1.4. 32860

La línea celular 32860 (Figura 21.D) se corresponde a una línea derivada de un carcinoma escamoso pobremente diferenciado localizado en supraglotis presente en un varón de 68 años de la especie *Homo sapiens*. La estadificación del tumor era pT3N1 por afectación ganglionar. Se trataba de un caso VPH negativo. Se desconoce las alteraciones moleculares de esta línea celular.

### 3.1.5. VCAP

La línea celular VCAP (Figura 21.E) corresponde a una línea celular derivada de un tumor de un varón de 59 años de la especie *Homo sapiens* que padecía un cáncer epitelial de próstata en estadio avanzado con metástasis óseas a nivel vertebral. Las alteraciones moleculares presentes en esta línea son p53 mutado, *MLH1* mutado y *TMPRSS2-ERG*.

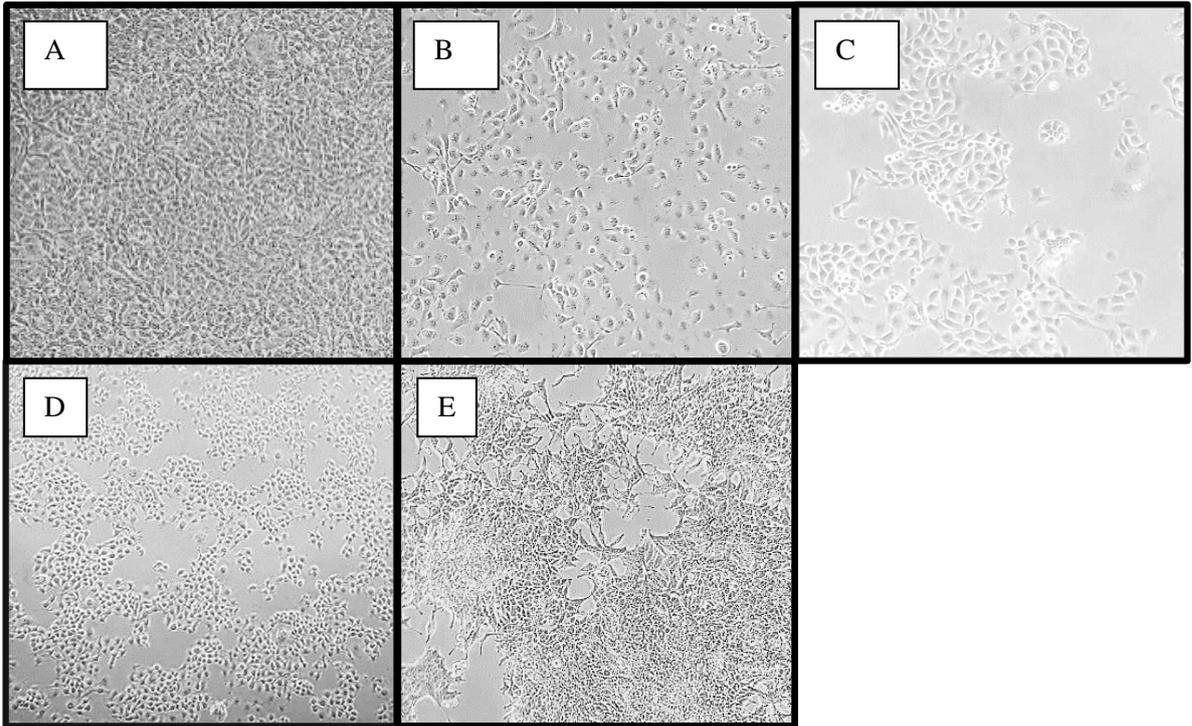


Figura 21. A. Línea celular MDA-MB-231. Imagen tomada con microscopio de luz (10x) de una placa en cultivo. B. Línea celular HCC-1937. Imagen tomada con microscopio de luz (10x) de una placa en cultivo. C. Línea celular CAL33. Imagen tomada con microscopio de luz (10x) de una placa en cultivo. D. Línea celular 32860. Imagen tomada con microscopio de luz (10x) de una placa en cultivo. E. Línea celular VCAP. Imagen tomada con microscopio de luz (10x) de una placa en cultivo.

### 3.2. Cultivos celulares

Las células fueron cultivadas en placas de 100 ml (Falcon) con medio RPMI 1640 con L-Glutamina suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (FBS) y 1% de penicilina/estreptomicina (100U/ml y 100µg/ml, respectivamente) (*Gibco, Life Tech*) para las líneas CAL33, 32860 y HCC-1937, y con medio DMEM con L-Glutamina suplementado con 10% FBS y 1% de penicilina/estreptomicina (*Gibco, Life Tech*) para MDA-MB-231 y VCAP, en el incubador a 37°C con una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% (*Cultek S.L.U.*).

Según la necesidad de células para los experimentos se fueron realizando divisiones celulares para mantener la línea celular y a la vez poder realizar los mismos. En primer lugar, se retiró el medio y se lavó la placa con 5 ml de tampón fosfato salino (PBS) para retirar todos los posibles restos celulares. A continuación, se añadió 1ml de solución *TrypLE Express* (*Gibco, Life Tech*), se mantuvieron durante 5-15 minutos en el incubador para despegar las células adheridas al fondo de la placa. Por último, se realizó una división de esas células para mantener la línea celular, o se utilizaron para el experimento correspondiente.

### 3.3. Agentes farmacológicos

Como agentes farmacológicos, moduladores de la autofagia, para combinación con RT se utilizaron CQ y panobinostat® (LBH589).

La CQ fue suministrada por la casa comercial *Sigma Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.* Se preparó una solución 50mM del fármaco, disolviendo para ello el fármaco en polvo en ddH<sub>2</sub>O al 0.5 % de DMSO. Las concentraciones empleadas para los experimentos según la línea celular vienen detalladas en la Tabla 1.

El panobinostat® (LBH589) fue comprado a *Novartis Pharmaceuticals, Basel, Suiza.* Se preparó a partir de un stock de 1mM o 100µM y como vehículo se utilizó DMSO. Para los distintos experimentos y según la línea celular se utilizaron las concentraciones detalladas en la Tabla 8.

Tabla 8. Concentraciones de los fármacos empleados según la línea celular.

	<b>MDA-MB-231</b>	<b>HCC-1937</b>	<b>VCAP</b>	<b>CAL-33</b>	<b>32860</b>
<b>CQ (µM)</b>					
	5	5	5	7,5	7,5
	10	10	10	15	15
	15	15	15	22,5	22,5
<b>LBH589 (nM)</b>	7	7	2,5	7,5	7
	14	14	5	15	14
	21	21	7,5	22,5	21

### 3.4. Radioterapia

El equipo empleado para la administración de la RT es el *Gammacell 1000 Elite* (Laboratorio de imagen molecular, Servicios de Nucleus, USAL). Se trata de un equipo de la casa *Nordion* y adquirido por la Universidad de Salamanca en septiembre 2006, teniendo las licencias y las instalaciones necesarias. Contiene una única fuente de Cesio-137 y cumple los requerimientos de seguridad *IAEA* de *Special Form Radioactive material*. El Cesio-137 tiene una vida media de 30 años.

Las líneas celulares se irradiaron en placas de 30mm. Se coloca hasta un total de 6 placas en un contenedor que se introduce en la cámara de irradiación (Figura 22). A continuación, en el panel de control se determina la dosis a administrar y se mantiene el tiempo correspondiente.



Figura 22. A. Equipo *Gammacell 1000 Elite*. B. Placas de 30 mm a irradiar.

Las características del equipo vienen detalladas en la tabla 9:

Tabla 9. Características técnicas de equipo de radiación, modificada de la suministrada por la casa comercial.

<b>Características del equipo</b>	
<b>Peso total del equipo</b>	1150 kg
<b>Altura</b>	155 cm
<b>Ancho</b>	80 cm
<b>Largo</b>	80 cm

Las dosis empleadas en los experimentos, ya sea como monoterapia o en combinación con los fármacos descritos son los siguientes (Tabla 10).

Tabla 10. Dosis de radioterapia (RT) (Gy) según las líneas celulares.

	<b>MDA-MB-231</b>	<b>HCC-1937</b>	<b>VCAP</b>	<b>CAL-33</b>	<b>32860</b>
<b>RT (Gy)</b>	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
<b>RT (Gy)</b>	5	5	5	5	5
<b>RT (Gy)</b>	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

### 3.5. Ensayo de apoptosis y cálculo de sinergismo

Se realizó un ensayo de apoptosis en las distintas líneas celulares. Para ello, se sembraron 30.000 células en placas de 30mm. El ensayo se llevó a cabo tanto en las células sin tratar como en las células tratadas con los fármacos con o sin RT a las 72h de radiarlas. En el caso de las células tratadas con los fármacos, éstas se incubaron previamente a la irradiación 24h y se mantuvo el tratamiento hasta las 72h posteriores al tratamiento con RT. Pasadas las 72h, el ensayo se realizó empleando el kit *FITC Apoptosis Detection Kit CE (Immunostep)*, en el que se marcan con anexina V y con yoduro de propidio las células y este marcaje nos permite distinguir las células vivas (anexina V-/yoduro de propidio-) de las apoptóticas tempranas (anexina V+/yoduro de propidio-) y apoptóticas tardías y necróticas (anexina V+/yoduro de propidio+) según las indicaciones de la casa comercial. Una vez marcadas, la muerte celular fue analizada mediante el citómetro *Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer*.

Para analizar si el tratamiento combinado de los distintos agentes tiene un efecto aditivo o sinérgico, se empleó el programa *Compusyn Software (ComboSyn, Inc)* que se basa en el método descrito por Chou-Talalay (233). Se introducen las dosis de los tratamientos empleados y la fracción alterada (Fa) correspondiente con el total de células muertas tras la administración de los mismos. Finalmente se obtiene un índice de combinación (CI). La interpretación de estos es:  $CI > 1$ : efecto antagónico;  $CI = 1$ : efecto aditivo;  $CI < 1$  efecto sinérgico.

Cada experimento contó de dos o tres replicas para asegurar la fiabilidad de los resultados. Al comprobar resultados similares se escogió todos los valores de un experimento para la representación gráfica y el análisis de los resultados. Se analizaron al menos 10.000 células con cada condición

### 3.6. Extracción de proteínas

Las proteínas fueron extraídas de las células sometidas a tratamiento con RT, CQ o LBH589, en diversas concentraciones, como tratamiento único o en combinación a las 72 horas de la administración de RT, así como de un control negativo sin ningún tratamiento de las líneas celulares previamente mencionadas.

En el proceso de extracción las células fueron recogidas de las placas de cultivo y se llevó a cabo en hielo para minimizar la degradación de las proteínas. En primer lugar, se aspiró el medio de las placas, se lavó con 5 ml de PBS, se tripsinizó con 0.5mL del reactivo *TrypLE Express (Gibco)*, se recogió el contenido y se centrifugó a 1800 r.p.m. durante cinco minutos a 4°C. A continuación, se aspiró el sobrenadante y se añadió 0.150ml de tapón de lisis (50 mM Tris, 130 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 % Triton x-100) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete™ Protease Inhibitor Cocktail, Roche*) con el fin de romper las membranas celulares e inhibir las proteasas para evitar la degradación de las proteínas.

Las placas se mantuvieron 30 minutos en hielo, dando un vórtex cada 15 minutos para realizar lisis mecánica que facilitara la rotura celular. Pasado ese tiempo se centrifugó 15 minutos a máxima velocidad y se transfieren los sobrenadantes que contienen las proteínas a nuevo tubo Eppendorf se reservan a -80°C.

Los extractos obtenidos se cuantificaron mediante la técnica de Bradford (234), basada en la formación de un complejo entre el colorante azul brillante de Coomassie G-250 y las proteínas presentes en las diferentes muestras. Como patrón, se emplea albúmina sérica bovina (BSA), a 5 concentraciones diferentes conocidas (0, 100, 250, 500, 750 µg/mL), para elaborar un patrón en un rango entre 0 y 750 µg/mL. Las muestras se prepararon según el protocolo del kit *Pierce™ Coomassie (Bradford) Protein Assay ThermoFisher Scientific* (Ref. 23236). Por último, se midió la absorbancia de las muestras a 570 nm mediante el lector de microplacas UltraEvolution (Tecan®)

### 3.7. Método *Western blot*

Esta técnica permite detectar proteínas específicas y caracterizar su tamaño, presencia de modificaciones post-traduccionales y comparar sus niveles entre distintas muestras. Para ello necesitamos un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único según la proteína que queramos analizar.

En primer lugar, las proteínas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Esto permite que las proteínas pierdan su estructura terciaria y cuaternaria, y adquieran carga negativa, permitiendo su migración al polo positivo al someterlas a un campo eléctrico.

Para separar las proteínas por su peso molecular, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida, al 8 % y 12 %. Para la parte inferior del gel se prepararon los geles con las concentraciones de acrilamida mencionadas; en la parte superior se preparó el gel concentrador al 4 % de acrilamida. Para que los geles polimerizaran se utilizó TEMED (tetrametiletilendiamina) y AMPS (persulfato de amonio) y, una vez gelificados, se cargaron 30 µg de cada una de las muestras proteicas previamente desnaturalizadas junto con un marcador de peso molecular (*ThermoFisher Scientific Ref. 26619*). A continuación, se llevó a cabo la electroforesis a un voltaje de 150V durante unos 75 minutos en un buffer compuesto por agua destilada (90%) y SDS 10x (10%). Una vez hecho esto, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas separadas a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF), aplicando un voltaje de 15 V durante 30 minutos (Biorad). Las membranas se tienen que activar previamente mediante metanol y agua destilada. Una vez terminada la transferencia, se bloquearon durante media hora en una solución de leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-T (0,1 % de Tween-20 en TBS) para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos. Pasado este tiempo, las membranas se incubaron durante 12 horas a 4°C con el anticuerpo primario específico de cada proteína a estudiar relacionada con la autofagia, diluido en TBS-T con BSA al 3%. A continuación, se realizaron tres lavados de 5, 7 y 10 minutos, respectivamente. El siguiente paso fue la incubación de las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente diluido 1:10000 en una solución de 0,2 g de leche en polvo en 3mL de TBS-T. El anticuerpo secundario reconoce al primario y permite su detección debido a su conjugación con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). En esta ocasión, también se realizaron los lavados con TBS-T previamente mencionados.

El último paso fue el revelado de las membranas por quimioluminiscencia. Al añadir el reactivo de revelado *TermoFisher Scientific* (Ref. 34580), se une a la peroxidasa del anticuerpo secundario, produciendo luz que es detectada al exponer la membrana a una película de rayos X. La peroxidasa cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrógeno. El tiempo de exposición de la membrana a la película de rayos X varía en función del anticuerpo primaria empleado.

La Tabla 11 recoge los anticuerpos primarios y secundarios empleados:

Tabla 11. Anticuerpos empleados

<b>Anticuerpo</b>	<b>Origen</b>	<b>Concentración WB</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Anticuerpos primarios</b>			
<b>Anti-p62</b>	Conejo	1:2000	<i>Ab109012 Abcam</i>
<b>Anti-Beclin1</b>	Conejo	1:1000	<i>3738S Cell signaling</i>
<b>Anti-LC3</b>	Conejo	1:1000	<i>NB600-L384 Novus Biologicals</i>
<b>Anti-β-actina</b>	Conejo	1:10000	<i>A2228 Sigma-Aldrich</i>
<b>Anticuerpos secundarios</b>			
<b>Anti-rabbit (HRP)</b>	Cabra	1:10000	<i>Ab205718 Abcam</i>
<b>Anti-mouse (HRP)</b>	Oveja	1:10000	<i>NXA931 GE Healthcare</i>



## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Estudio de las líneas celulares derivadas de cáncer de mama

El tratamiento de las líneas celulares MDA-MB-231 y HCC-1937 mostró que ambas son radiosensibles con una disminución de la supervivencia celular proporcional al aumento de dosis de RT (Figura 25). Respecto a los fármacos modificadores de autofagia, en la línea MDA-MB-231, el aumento progresivo de la dosis de CQ produjo un leve aumento de muerte celular, que se mantuvo estable con la dosis más elevada (Figura 25). Por otro lado, LBH589 produjo una disminución más pronunciada de la supervivencia celular (Figura 23). En el caso de la línea celular HCC-1937, la CQ provoca una gran disminución de la viabilidad celular, especialmente la dosis de 15  $\mu\text{M}$  (Figura 24). El LBH589 produjo un aumento leve de la muerte celular con la primera dosis (7nM), pero se vio que no continuaba aumentando a pesar de aumentar la dosis de este fármaco (Figura 24).

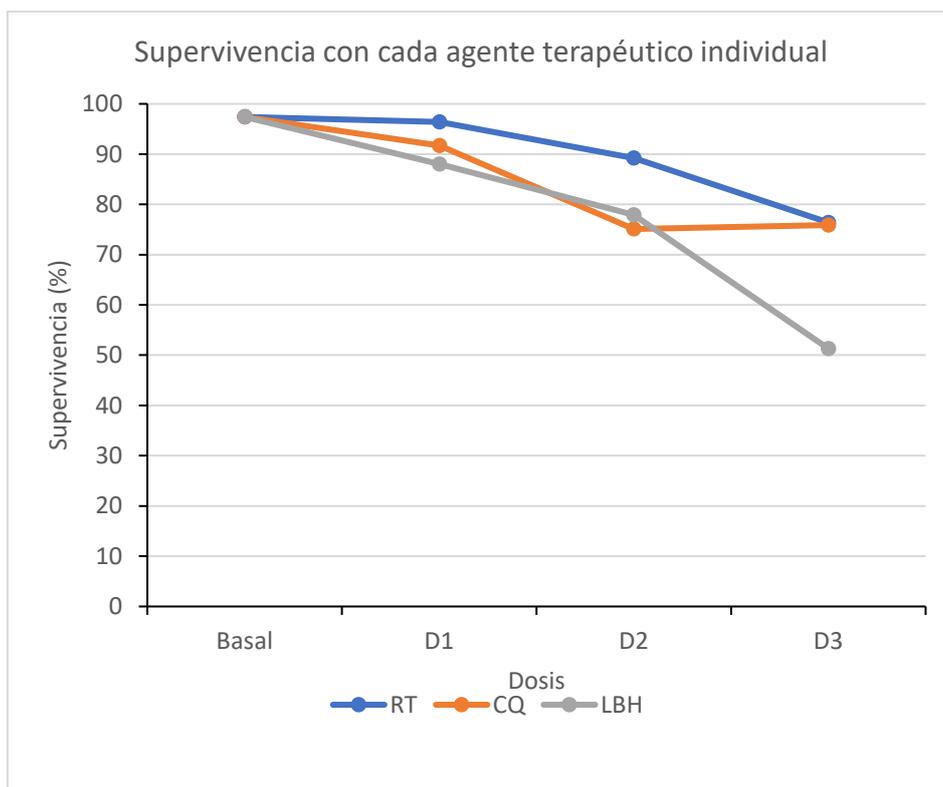


Figura 23. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia en la línea celular MDA-MB-231. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5  $\mu\text{M}$ , D2 10  $\mu\text{M}$ , D3 15  $\mu\text{M}$ . Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM.

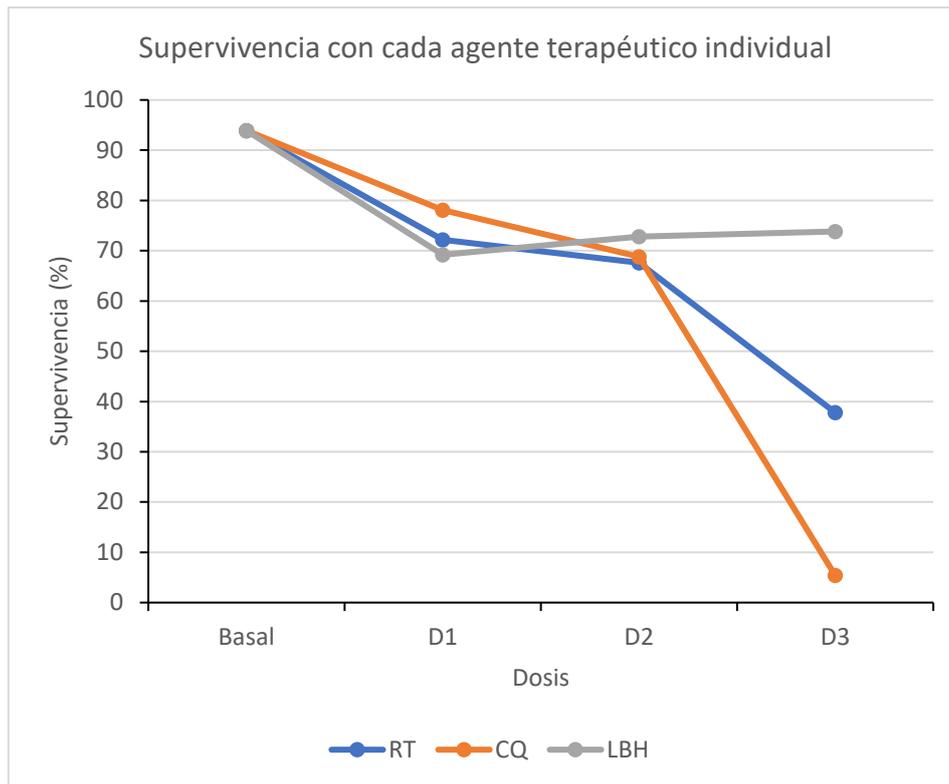


Figura 24. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia en la línea celular HCC-1937. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5  $\mu$ M, D2 10  $\mu$ M, D3 15  $\mu$ M. Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM.

La representación gráfica del porcentaje de supervivencia y muerte celulares, así como la fracción alterada (Fa) analizadas mediante citometría de flujo se muestra a continuación para cada dosis de RT, CQ y LBH589 en la línea celular MDA-MB-231 (Tabla 12, Figura 25) y para HCC-1937 (Tabla 13, Figura 26).

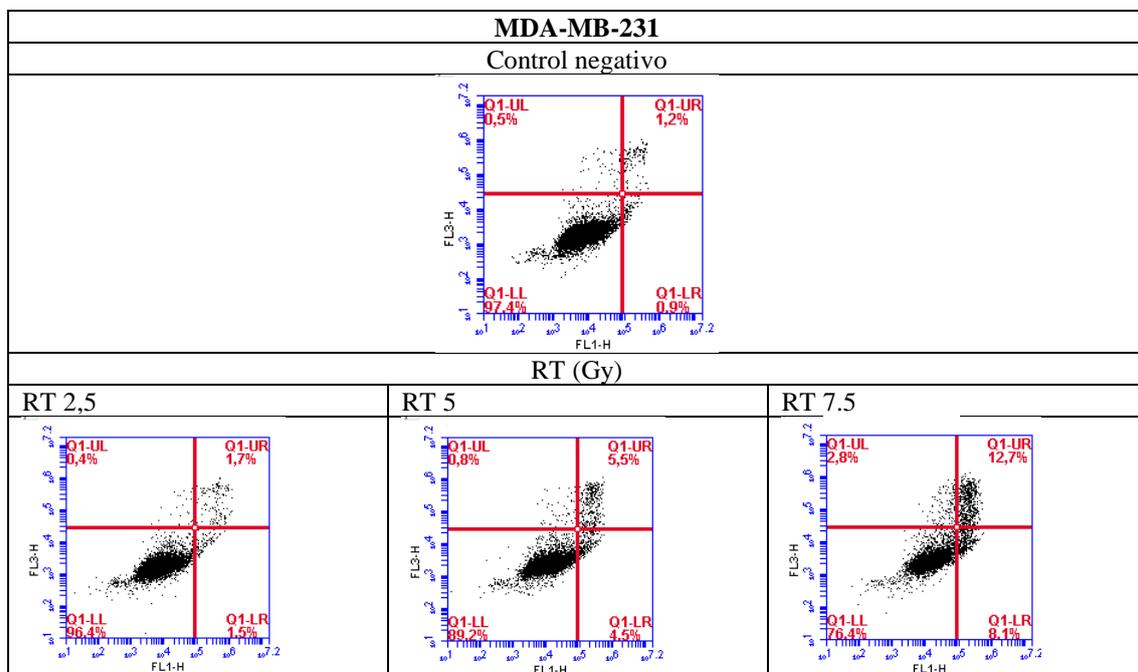
Tabla 12. Porcentajes de supervivencia y muerte celulares en la línea MDA-MB-231 tras la administración de RT, CQ y LBH589 a dosis creciente. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Fa: fracción alterada.

Tratamiento	C-	RT	RT	RT	CQ	CQ	CQ	LBH	LBH	LBH
CQ ( $\mu$ M)					5	10	15			
LBH589 (nM)								7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5						
Supervivencia (%)	97,4	96,4	89,2	76,4	91,7	75,1	75,9	88	77,9	51,3
Mortalidad (%)	2,6	3,6	10,8	23,6	8,3	24,9	24,1	12	22,1	48,7
Fa	0,02	0,03	0,10	0,23	0,08	0,24	0,24	0,12	0,22	0,48

Tabla 13. Porcentaje de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular HCC-1937 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Fa: fracción alterada.

Tratamiento	C-	RT	RT	RT	CQ	CQ	CQ	LBH	LBH	LBH
CQ (μM)					5	10	15			
LBH589 (nM)								7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5						
Supervivencia (%)	93,9	72,2	67,6	37,8	78,1	68,8	5,4	69,2	72,8	73,8
Mortalidad (%)	6,1	27,8	32,4	62,2	21,9	31,2	94,6	30,8	27,2	26,2
Fa	0,06	0,27	0,32	0,62	0,21	0,31	0,94	0,30	0,27	0,26

La muerte celular viene representada por apoptosis temprana y tardía, así como por necrosis. En la línea MDA-MB-231, se observa que a dosis crecientes de radiación ionizante los tres tipos de muerte celular representados aumentan progresivamente (Figura 25). Respecto a los dos fármacos, la administración de CQ produce un aumento del porcentaje total de muerte celular en las dosis más altas, aunque estable, debido fundamentalmente a la apoptosis, tanto temprana como tardía (Figura 25). Por su parte, LBH589 produce un aumento progresivo de los tres tipos de muerte celular recogidos, mayor en el caso de la apoptosis tardía y de la necrosis (Figura 25).



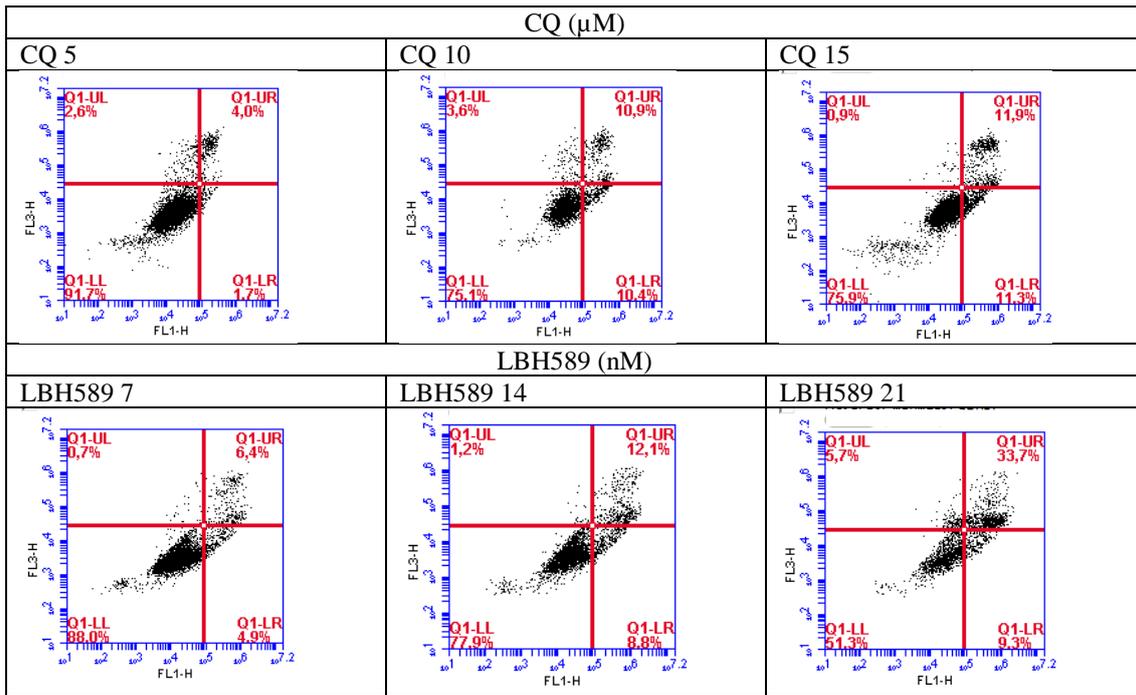
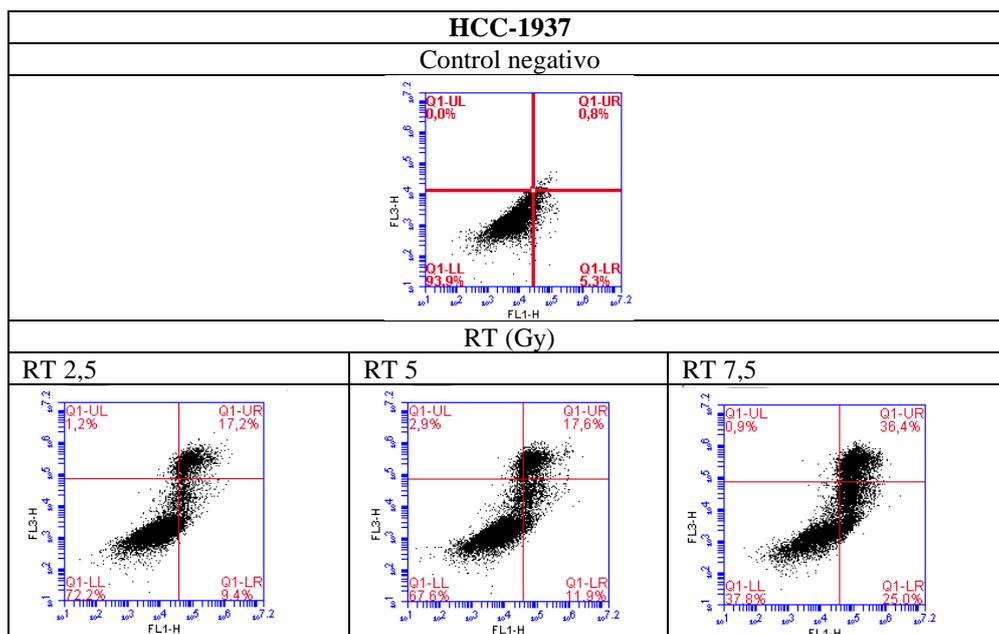


Figura 25. Análisis de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Respecto a la línea HCC-1937, también se observa un aumento progresivo del porcentaje global de muerte celular a medida que se aumenta la dosis de irradiación y de CQ (Figura 26). Por otro lado, la administración de LBH589 produce muerte celular que se mantiene similar a dosis crecientes (Figura 26). Ante los tres tratamientos, se observa un aumento de los tres tipos de muerte celular.



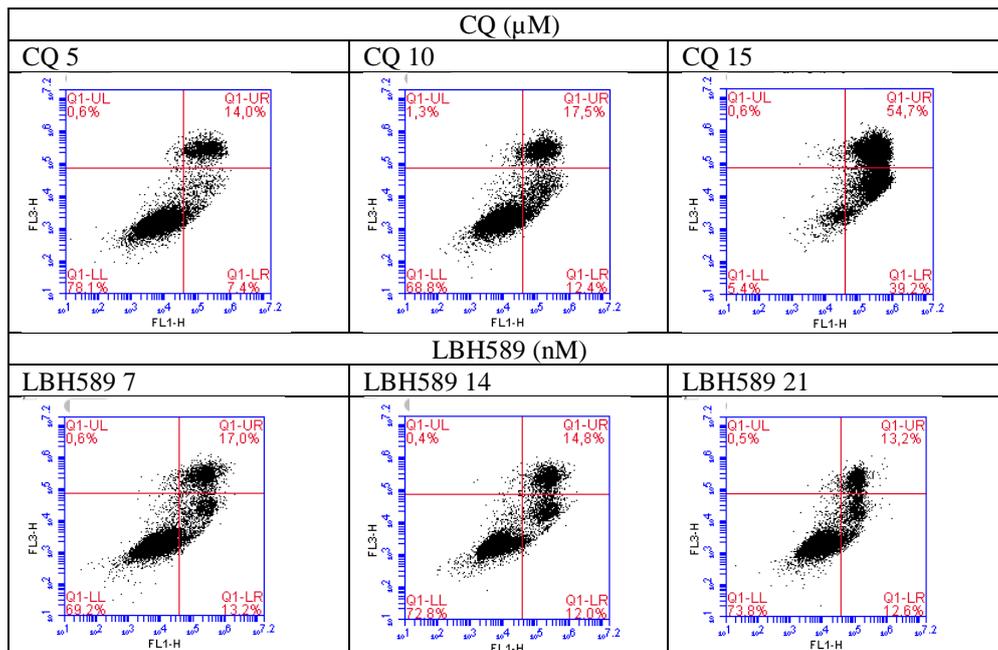


Figura 26. Análisis de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular HCC-1937 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Las siguientes figuras representan la comparación de cada tratamiento administrado de forma individual y su combinación en la línea celular MDA-MB-231, tanto para RT y CQ (Figura 27), como RT y LBH589 (Figura 28). Se puede observar una disminución de la supervivencia celular en ambas combinaciones mayor que la obtenida con cada agente en monoterapia. En relación a nuestra hipótesis, estos resultados podrían confirmar que la combinación de RT a dosis bajas con un agente modulador de la autofagia permite potenciar el efecto de la radiación ionizante. La dosis media (D2) y alta (D3) de RT más CQ supera el efecto de cualquiera de la dosis de radiación ionizante en monoterapia (Figura 27). Por otro lado, la combinación a dosis bajas de (D1) de RT y LBH589 produce un efecto similar al observado con la dosis más alta (D3) de RT en monoterapia (Figura 30). Es decir, la adición de un agente modulador de la autofagia permite disminuir la dosis de RT a emplear para obtener el mismo nivel de muerte celular.

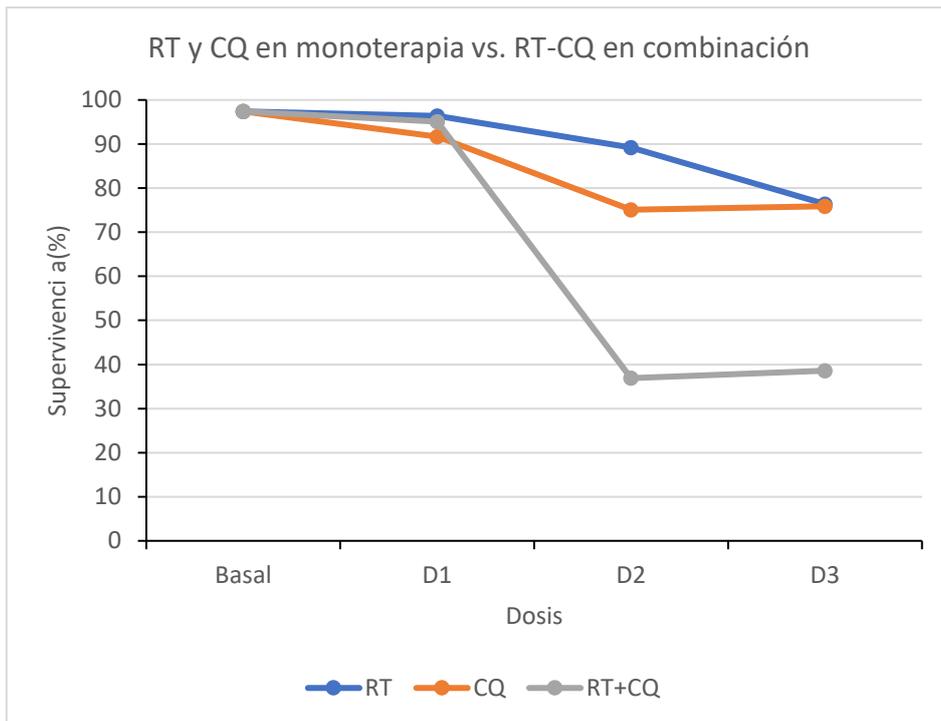


Figura 27. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y CQ) y su combinación (RT + CQ) en la línea celular MDA-MB-231. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5  $\mu$ M, D2 10  $\mu$ M, D3 15  $\mu$ M. Dosis RT+CQ: D1 2,5 Gy + 5  $\mu$ M, D2 5 Gy + 10  $\mu$ M, D3 7,5 Gy + 15  $\mu$ M.

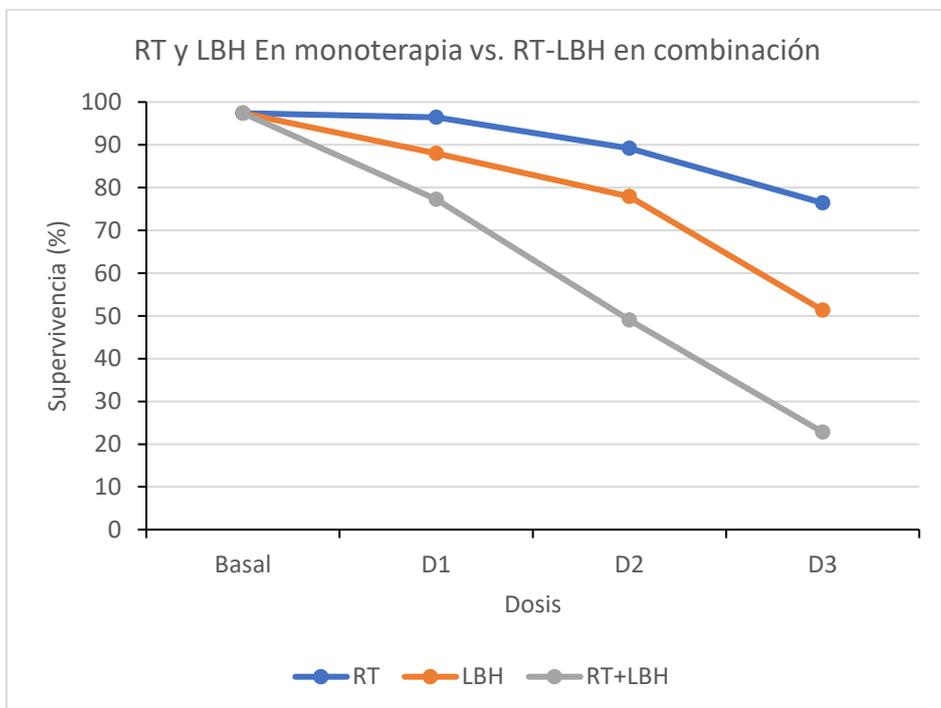


Figura 28. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y LBH589) y su combinación (RT + LBH589) en la línea celular MDA-MB-231. RT: radioterapia. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM. Dosis RT+LBH589: D1 2,5 Gy + 7 nM, 5 Gy + 14 nM, 7,5 Gy + 21 nM.

El porcentaje de supervivencia analizado mediante citometría de flujo se muestra representado en las siguientes gráficas para los tratamientos combinados de RT más CQ, y RT más LBH589, junto a los tratamientos en monoterapia (Figura 29 y 30). La combinación de radiación ionizante y CQ produce un claro aumento de la muerte celular respecto al control incluso en la combinación a dosis más bajas (RT 2,5 + CQ 5) que se mantiene estable en las combinaciones de dosis medias y altas. Este porcentaje de muerte celular incluye muerte celular apoptótica, tanto temprana como tardía, y necrosis (Figura 29).

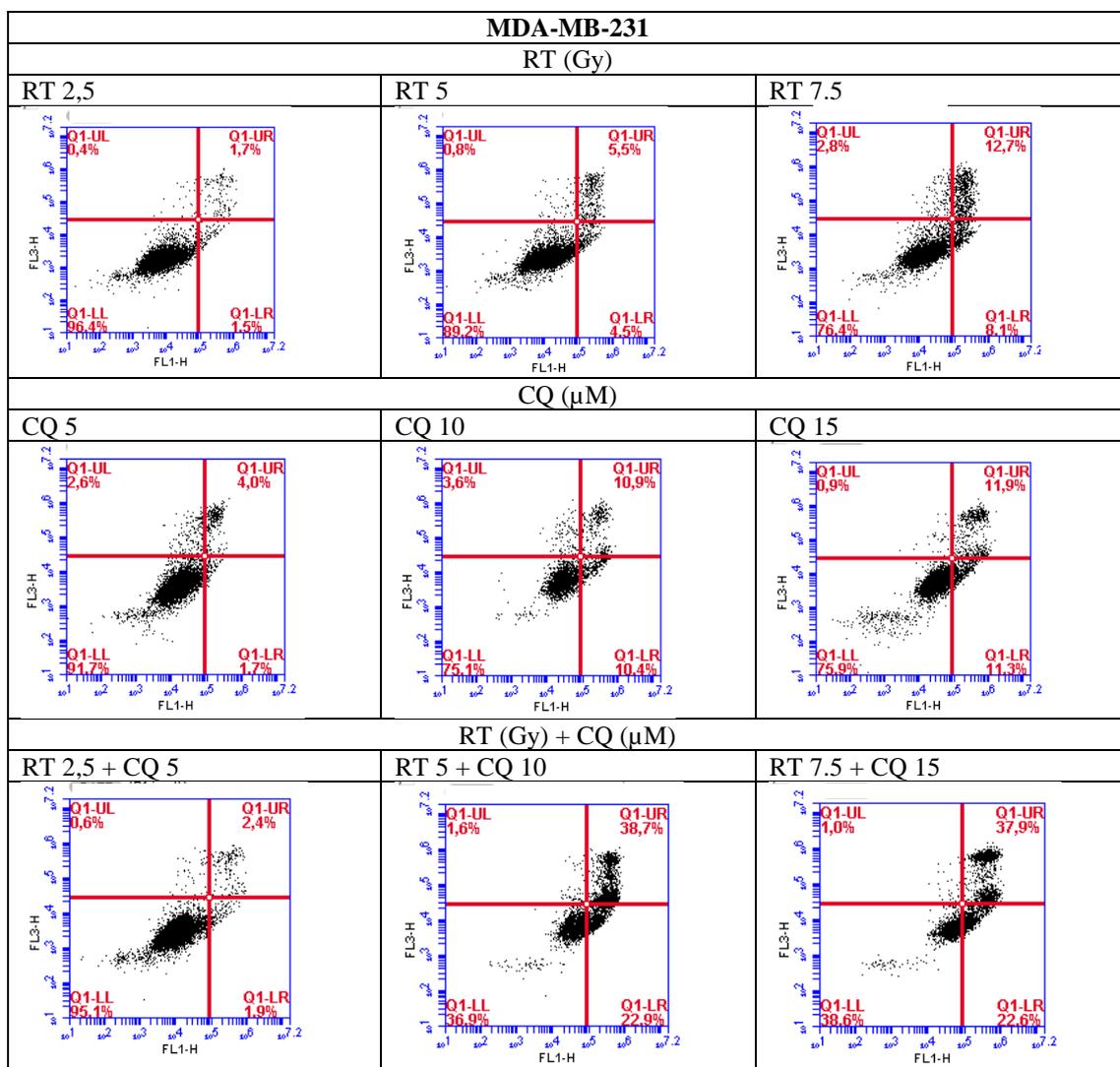


Figura 29. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231 empleando tratamiento en monoterapia de RT y LCQ, así como su combinación RT+CQ. RT: radioterapia. CQ: cloroquina.

También la combinación de RT con LBH589 produce un claro aumento del porcentaje de muerte celular. En esta ocasión se observa que es la muerte apoptótica tardía y la necrosis la que sufren un mayor aumento a dosis crecientes, mientras que la apoptosis temprana se mantiene más o menos estable a pesar del aumento de las dosis combinadas (Figura 30). Por otro lado, se puede observar que el tratamiento combinado supera el efecto alcanzado con RT en monoterapia y que la combinación de dosis bajas de irradiación con LBH589 iguala y mejora el efecto producido por la dosis más alta de radiación ionizante.

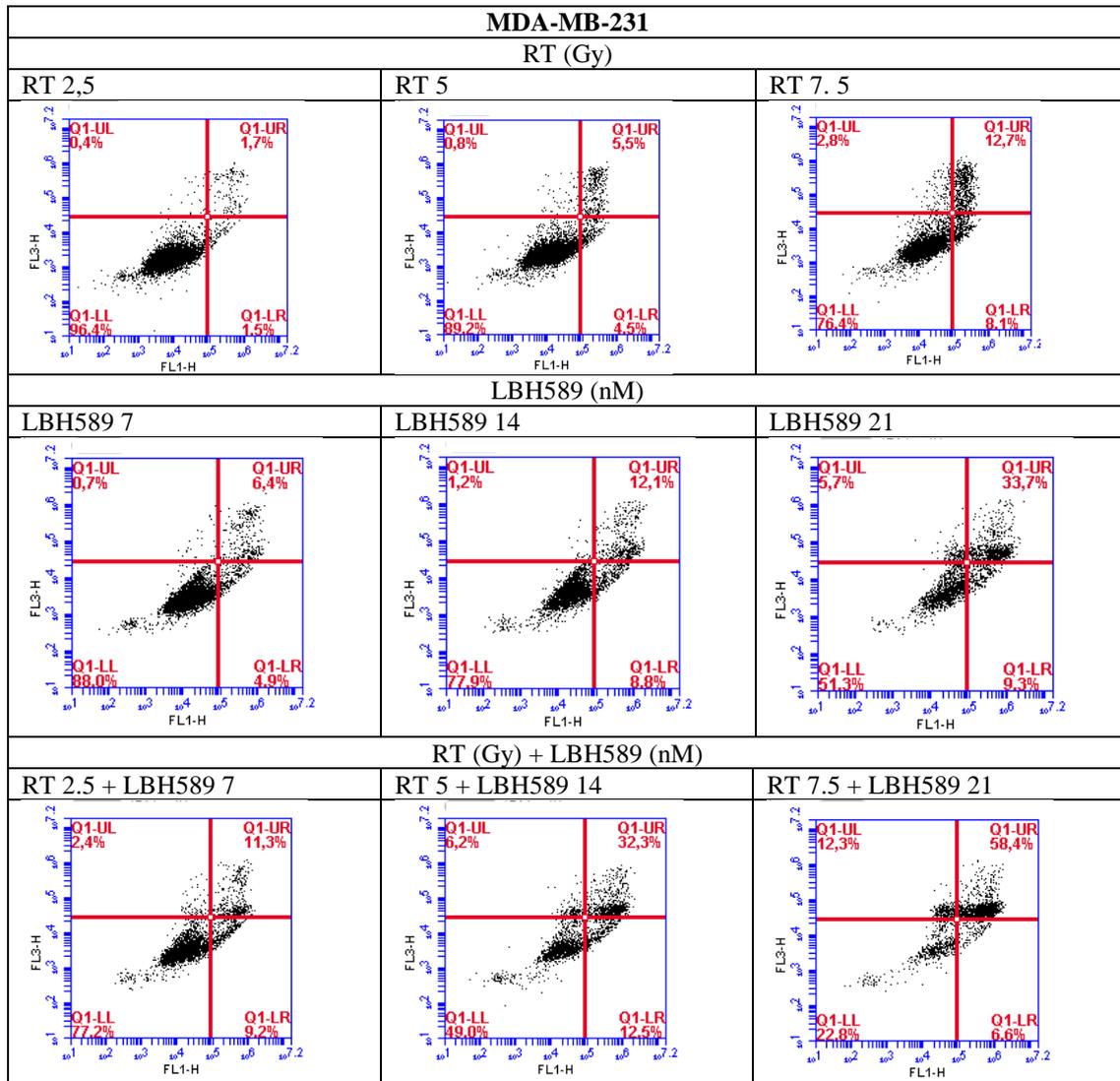


Figura 30. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular MDA-MB-231 empleando tratamientos en monoterapia de RT y LBH589, así como su combinación y RT+LBH589. RT: radioterapia. LBH: LBH589.

El tratamiento combinado de la línea MDA-MB-231, tanto RT con CQ, como RT con LBH589, mostró un aumento de la muerte celular apoptótica y/o no apoptótica frente al tratamiento con radiación ionizante en monoterapia. Para determinar si se trataba de un

efecto sinérgico o aditivo, se procedió a utilizar el método *Chou-Talalay* y mediante el índice de combinación (CI) comprobando que este efecto era sinérgico (CI inferior a 1) en todas las combinaciones de RT y LBH589, así como en la combinación de RT y CQ a dosis medias y altas (Tabla 14).

Tabla 14. Análisis mediante el método *Chou-Talalay* en la línea MDA-MB-231. CI < 1: efecto sinérgico (0,85-0,9: leve; 0,7-0,85: moderado; 0,3-0,7: normal; 0,1-0,3: fuerte). CI > 1 efecto antagonico. CI =1: efecto aditivo. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Fa: fracción alterada

Tratamiento	C-	RT-CQ	RT-CQ	RT-CQ	RT-LBH	RT-LBH	RT-LBH
CQ (µM)		5	10	15			
LBH589 (nM)					7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
Supervivencia (%)	97,4	95,1	36,9	38,6	77,2	49	22,8
Mortalidad (%)	2,6	4,9	63,1	61,4	22,8	51	77,2
Fa	0,02	0,04	0,63	0,61	0,22	0,51	0,77
CI		2,58	0,46	0,72	0,92	0,9	0,69

La línea celular HCC-1937 también se sometió al tratamiento combinado de RT con los dos moduladores de la autofagia. El efecto alcanzado por la combinación de radiación ionizante y CQ no mejora el alcanzado por la RT en monoterapia. De forma secundaria, se observa que tampoco mejora el efecto de la CQ en monoterapia (Figura 31).

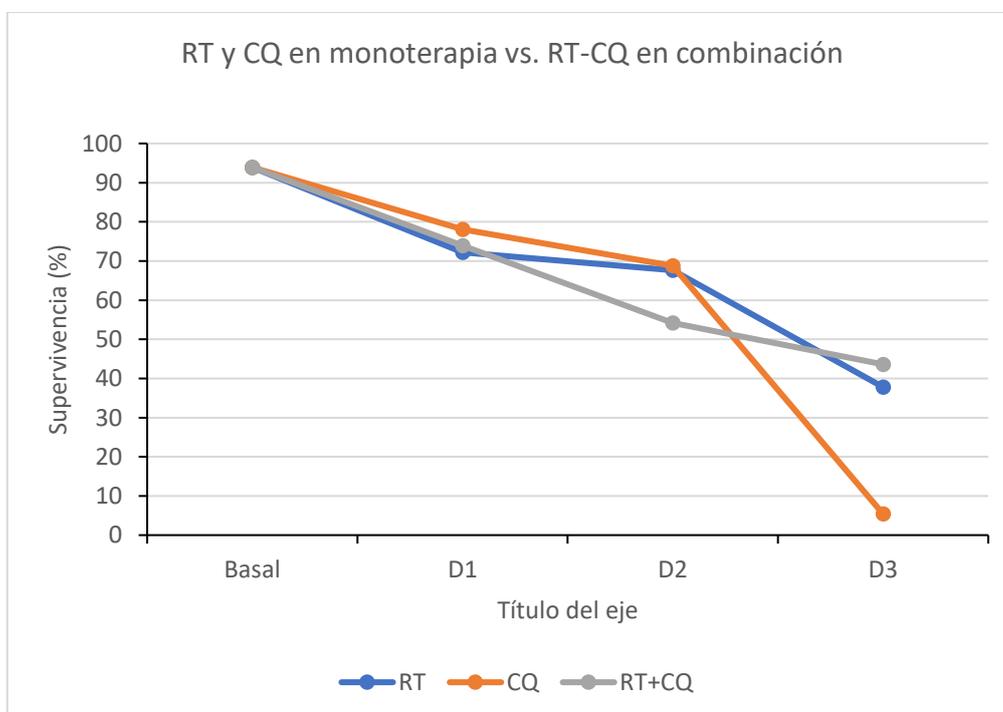


Figura 31. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y CQ) y su combinación (RT + CQ) en la línea celular HCC-1937. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5 µM, D2 10 µM, D3 15 µM. Dosis RT+CQ: D1 2,5 Gy + 5 µM, D2 5 Gy + 10 µM, D3 7,5 Gy + 15 µM.

La combinación de RT y LBH589 para la línea HCC-1937 tampoco mejora los resultados de la RT en monoterapia, incluso se produce menos muerte celular tras la administración del tratamiento combinado vs. tratamiento individual (Figura 32).

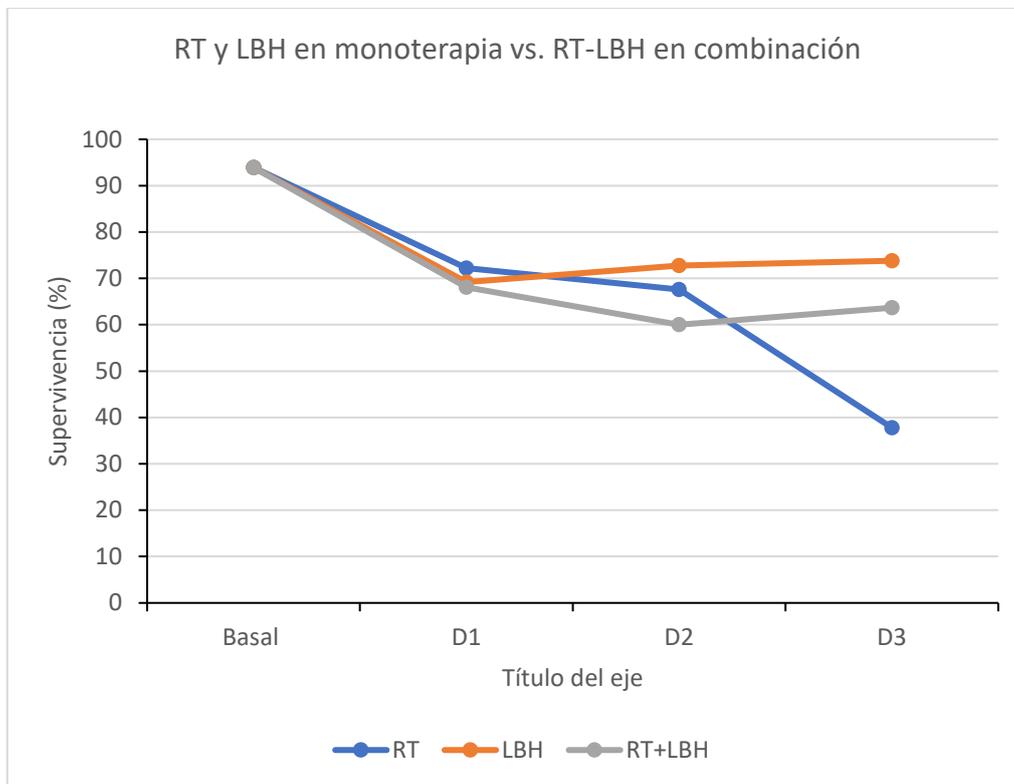


Figura 32. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y LBH589) y su combinación (RT + LBH589) en la línea celular HCC-1937. RT: radioterapia. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM. Dosis RT+LBH589: D1 2,5 Gy + 7 nM, 5 Gy + 14 nM, 7,5 Gy + 21 nM.

La representación gráfica de la supervivencia celular en la línea HCC-1937 mediante citometría de flujo para los tratamientos combinados de RT más CQ, y RT más LBH589 se presenta a continuación (Figura 33 y 34). Aunque la combinación de RT y CQ no aumenta la muerte celular alcanzada por ninguno de los tratamientos en monoterapia, la muerte producida se debe fundamentalmente a muerte apoptótica temprana, tardía y necrosis (Figura 33).

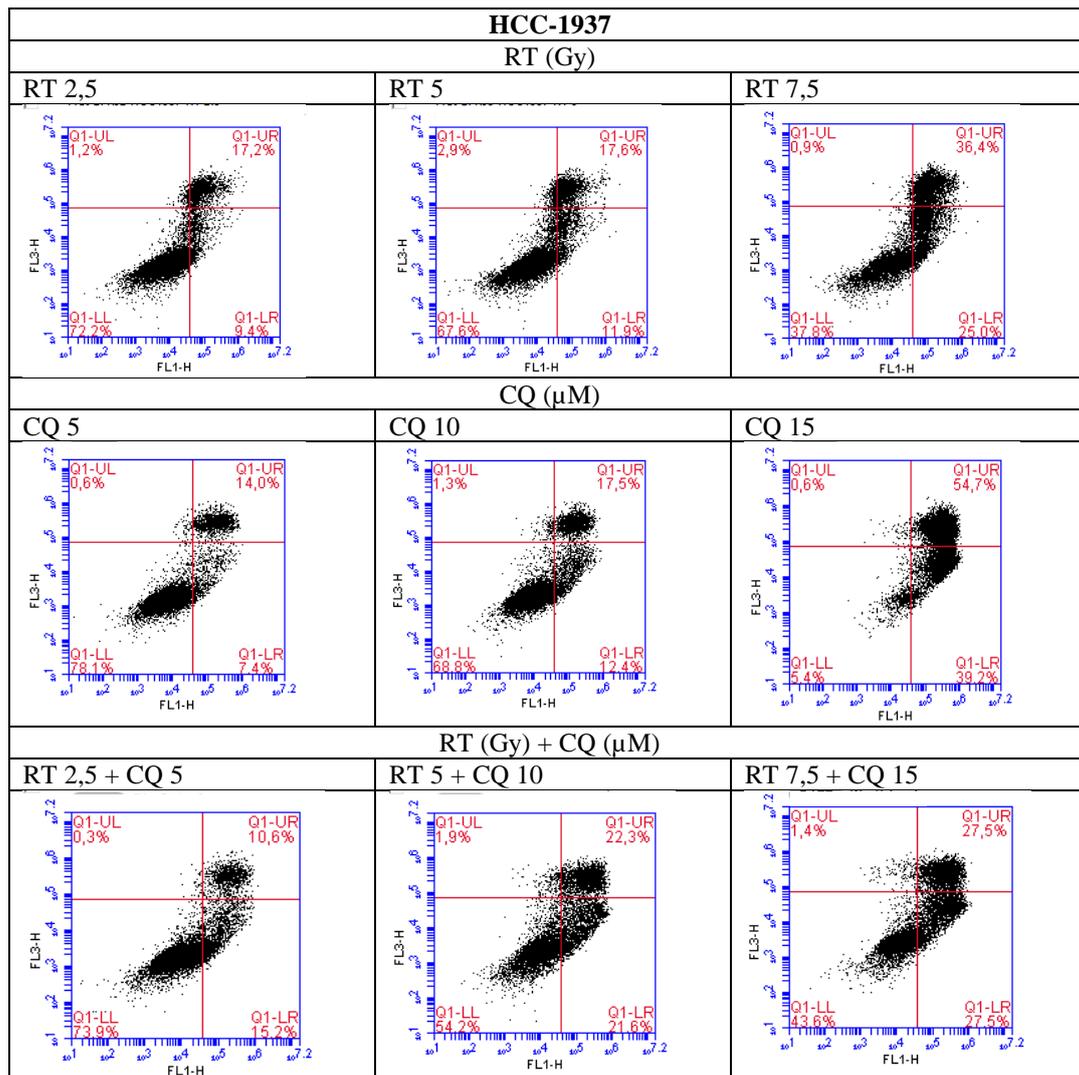
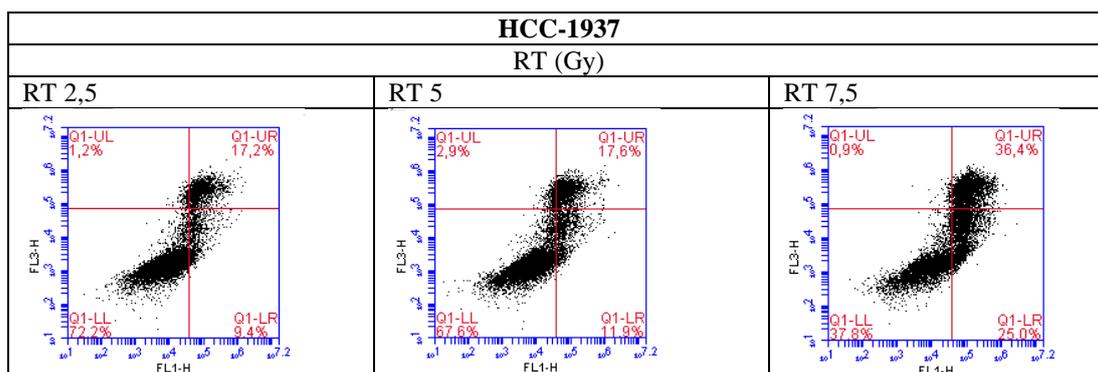


Figura 33. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular HCC-1937 empleando tratamiento en monoterapia de RT y CQ, así como su combinación RT+CQ. RT: radioterapia. CQ: cloroquina.

La misma situación se da para la combinación de radiación ionizante y LBH589. La muerte celular secundaria por este tratamiento combinado incluye apoptosis temprana, tardía y necrosis (Figura 34).



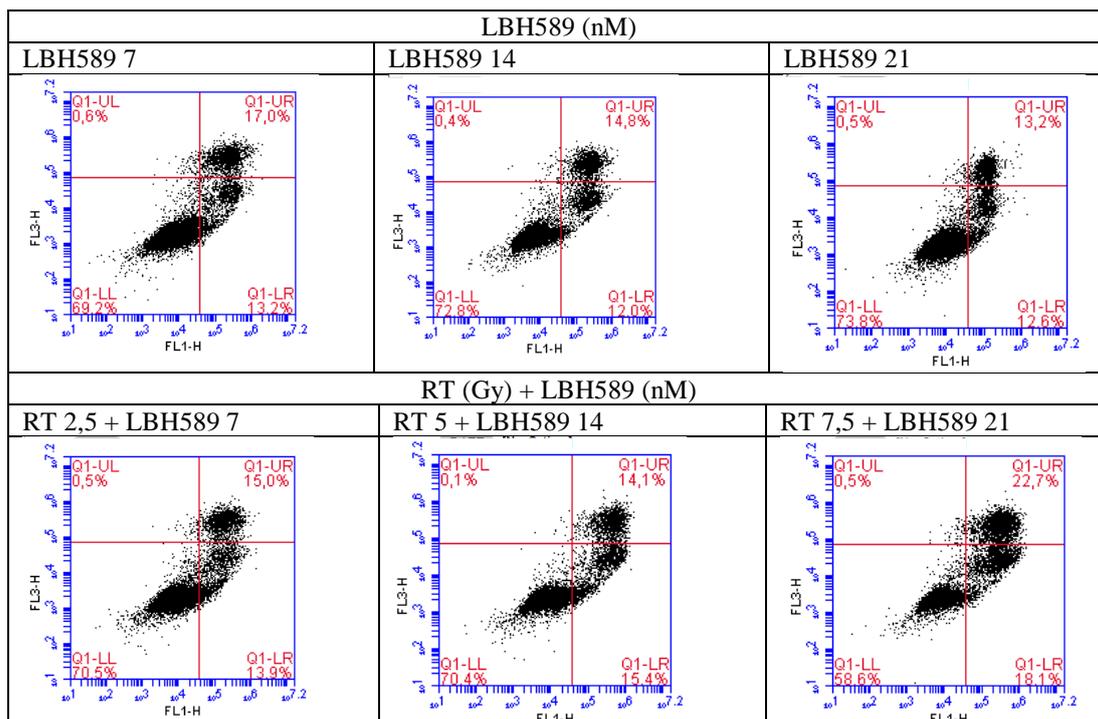


Figura 34. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular HCC-1937 empleando tratamientos en monoterapia de RT y LBH589, así como su combinación RT+LBH589. RT: radioterapia. LBH: LBH589.

Como se hizo en la línea MDA-MB-231, se analizó cómo era el tipo de efecto resultante de la combinación de RT tanto con CQ como con LBH589 mediante el método *Chou-Talalay* para la línea HCC-1937 (Tabla 15). A diferencia de la anterior, para HCC-1937 además de no alcanzar un efecto mayor con la combinación de tratamientos respecto a los individuales, el CI resultó ser mayor a 1. Según este índice esto quiere decir efecto antagónico.

Tabla 15. Análisis mediante el método *Chou-Talalay* en la línea celular HCC-1937. CI < 1: efecto sinérgico (0,85-0,9: leve; 0,7-0,85: moderado; 0,3-0,7: normal; 0,1-0,3: fuerte). CI > efecto antagónico. CI =1: efecto aditivo. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tratamiento	C-	RT-CQ	RT-CQ	RT-CQ	RT-LBH	RT-LBH	RT-LBH
CQ (µM)		5	10	15			
LBH589 (nM)					7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
Supervivencia (%)	93,9	73,9	54,2	43,6	70,5	70,4	58,6
Mortalidad (%)	6,1	26,1	45,8	56,4	29,5	29,6	41,4
Fa	0,06	0,26	0,45	0,56	0,29	0,29	0,41
CI		1,7	2,1	2,6	1,5	3,1	44,1

#### 4.2. Estudio de las líneas celulares derivadas de tumores de área de cabeza y cuello

El tratamiento de las líneas celulares CAL33 y 32860 mostró un aumento de la muerte celular a dosis crecientes de radiación ionizante (Figuras 37 y 38). En cambio, para los dos fármacos modificadores de la autofagia, CQ y LBH589, en la línea celular CAL33 la supervivencia celular se mantuvo estable a pesar de aumentar la dosis administrada (Figura 35). En el caso de la línea 32860, sí se observó una disminución progresiva de la supervivencia celular a medida que se aumentaba la dosis de CQ; respecto a LBH589 se produjo una leve disminución de la supervivencia celular a partir de la segunda dosis (14nM) (Figura 36).

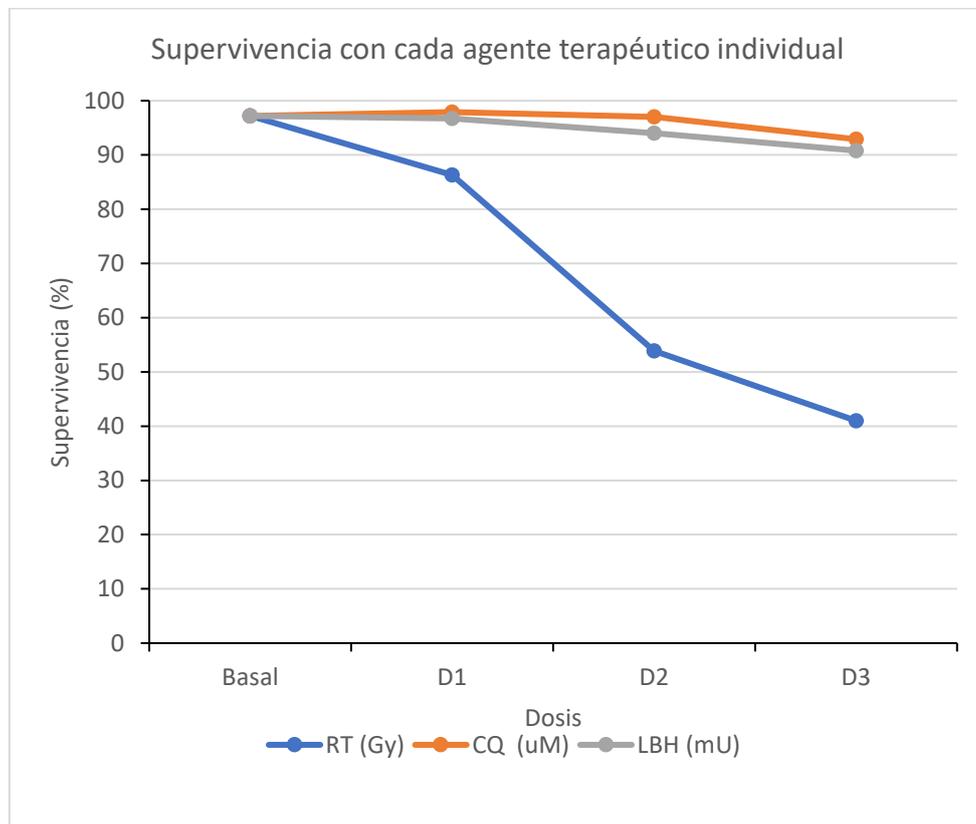


Figura 35. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia en la línea celular CAL33. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 7,5  $\mu$ M, D2 15  $\mu$ M, D3 22,5  $\mu$ M. Dosis LBH589: D1 7,5 nM, D2 15 nM, D3 22,5 nM.

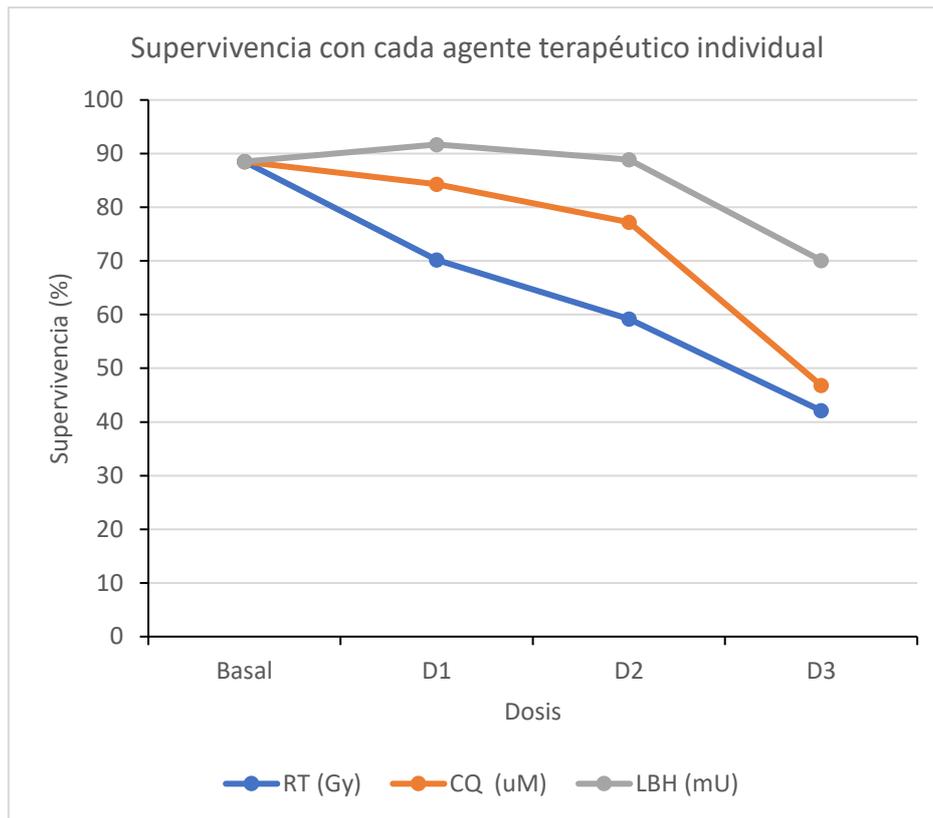
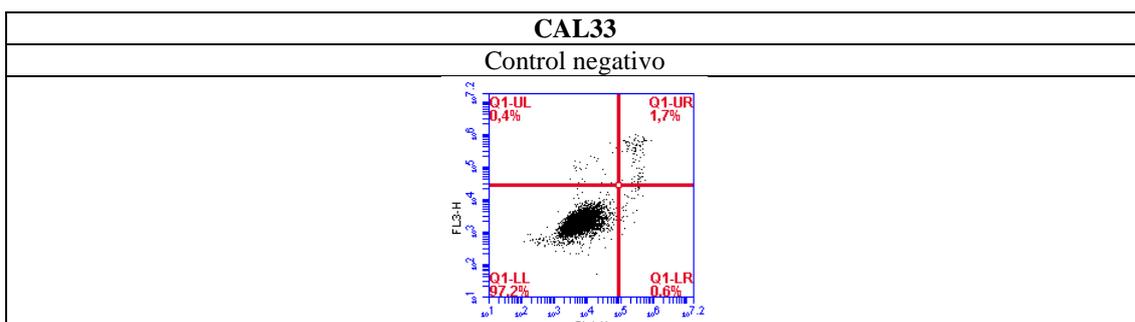


Figura 36. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia en la línea celular 32860. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 7,5  $\mu$ M, D2 15  $\mu$ M, D3 22,5  $\mu$ M. Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM.

El porcentaje de supervivencia analizado mediante citometría de flujo se muestra representado a continuación para cada dosis de RT, CQ y LBH589 para la línea celular CAL33 (Figura 37 y Tabla 16) y 32860 (Figura 38 y Tabla 17).

La administración de RT a dosis crecientes produce un aumento de la muerte celular en la línea CAL33 que se debe a la apoptosis, fundamentalmente tardía, y a la necrosis (Figura 37). Como ya se ha comentado, la administración de ambos moduladores de autofagia no produce una muerte celular significativa a pesar del aumento de dosis y la que hay es, sobre todo, por muerte apoptótica.



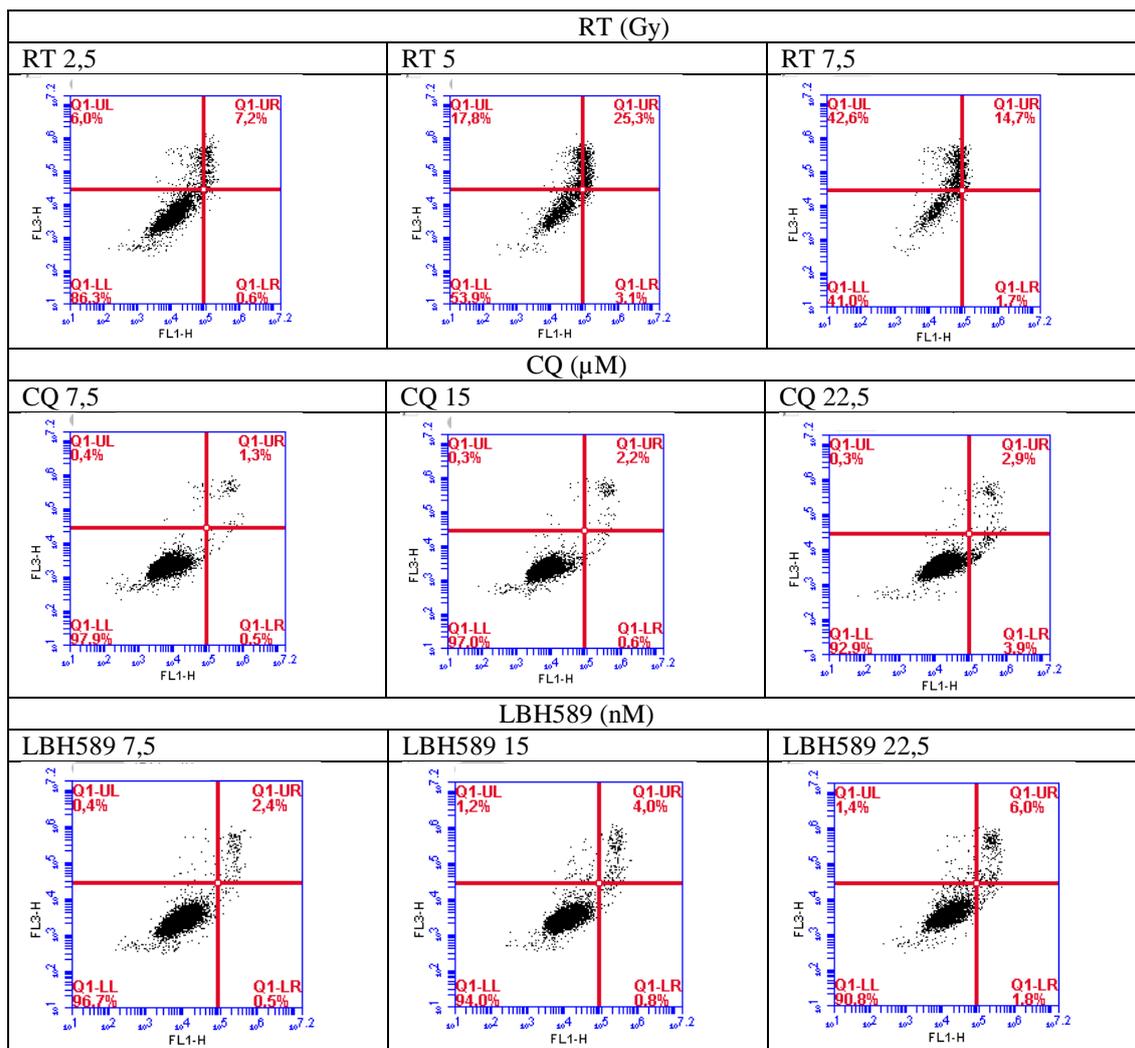


Figura 37. Análisis de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular CAL33 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tabla 16. Porcentaje de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular CAL33 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Fa: fracción alterada.

Tratamiento	C-	RT	RT	RT	CQ	CQ	CQ	LBH	LBH	LBH
CQ (μM)					7,5	15	22,5			
LBH589 (nM)								7,5	15	22,5
RT (Gy)		2,5	5	7,5						
Supervivencia (%)	97,2	86,3	53,9	41	97,9	97	92,9	96,7	94	90,8
Mortalidad (%)	2,8	13,7	46,1	59	2,1	3	7,1	3,3	6	9,2
Fa	0,02	0,13	0,46	0,59	0,02	0,03	0,07	0,03	0,06	0,09

En la línea celular 32860 también se observa un claro aumento de la muerte celular tras la administración de RT, que incluye apoptosis temprana, tardía y necrosis (Figura 38). En esta ocasión, el tratamiento con CQ sí produce un aumento de la muerte celular a medida que se aumenta la dosis y se corresponde con muerte por apoptosis,

fundamentalmente temprana en las dosis más altas (Figura 38). Por último, el tratamiento con LBH589 conlleva un aumento de la muerte celular que también corresponde con muerte apoptótica, aunque más por apoptosis tardía y necrosis que temprana (Figura 38).

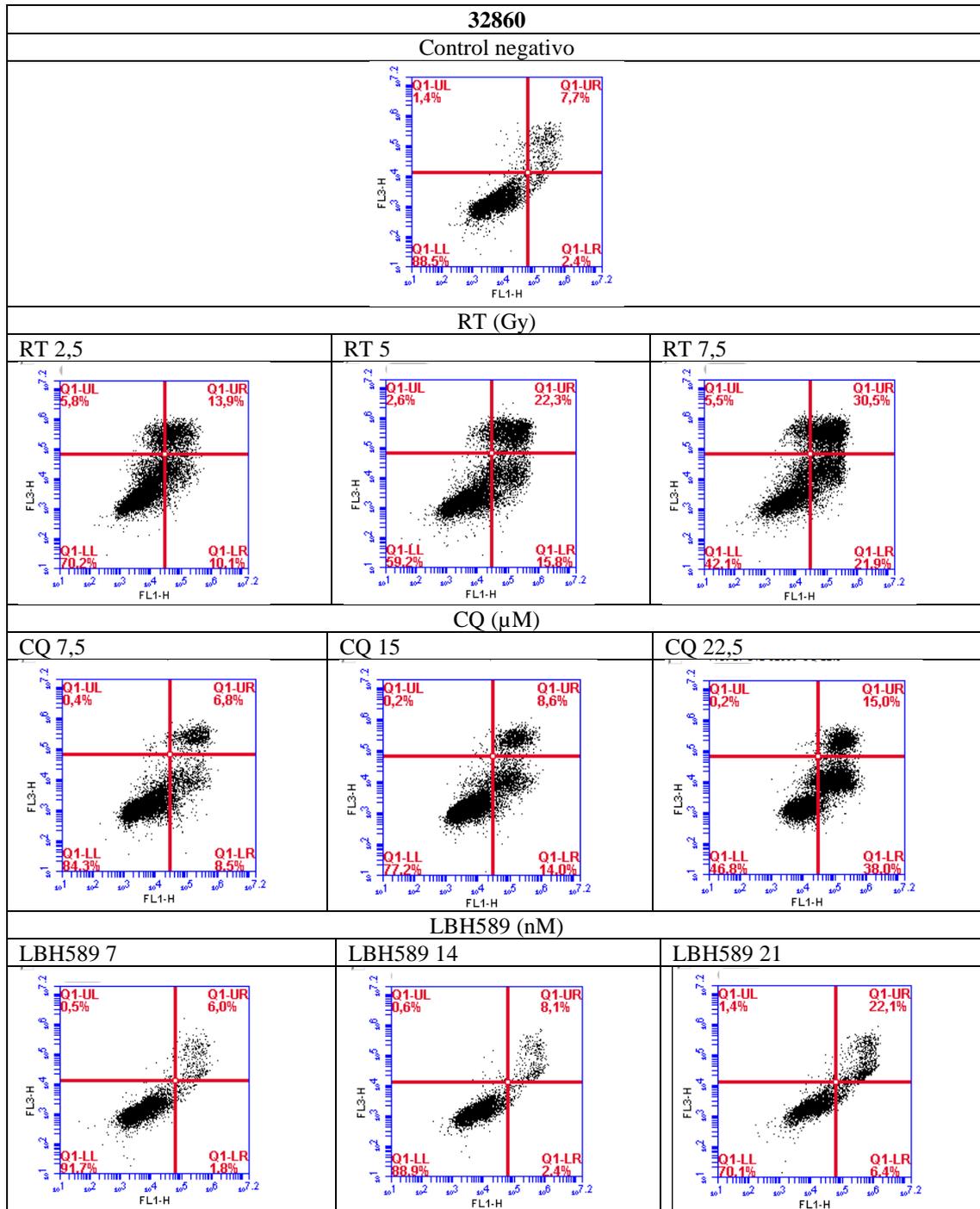


Figura 38. Análisis de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular 32860 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tabla 17. Porcentaje de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular 32860 empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Fa: fracción alterada.

Tratamiento	C-	RT	RT	RT	CQ	CQ	CQ	LBH	LBH	LBH
CQ (µM)					7,5	15	22,5			
LBH589 (nM)								7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5						
Supervivencia (%)	82,5	70,2	59,2	42,1	84,3	77,2	46,8	91,7	88,9	70,1
Mortalidad (%)	17,5	29,8	40,8	57,9	15,8	22,8	53,2	8,3	11,1	29,9
Fa	0,17	0,29	0,40	0,57	0,15	0,22	0,53	0,08	0,11	0,29

El estudio de la respuesta al tratamiento combinado en la línea CAL33 mostró una mayor supervivencia tras la administración de RT más CQ, respecto a la radiación ionizante en monoterapia (Figura 39). De manera secundaria, se observó que la combinación mejora el resultado de la CQ como tratamiento individual (Figura 39).

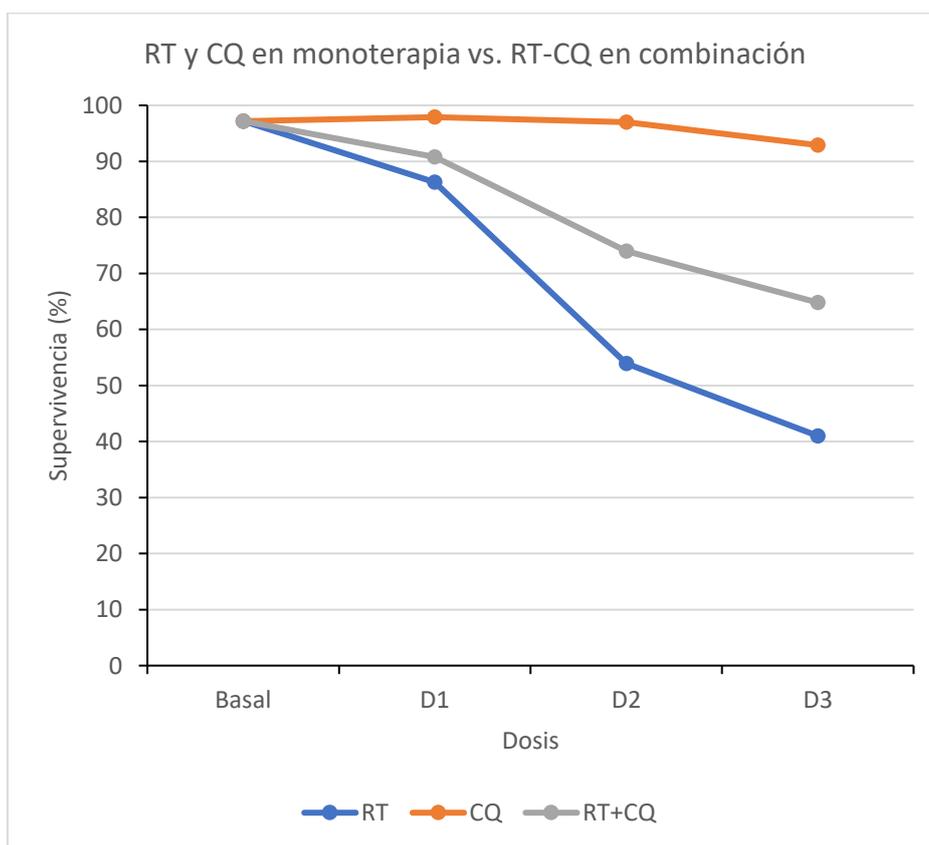


Figura 39. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y CQ) y su combinación (RT + CQ) en la línea celular CAL33. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 7,5 µM, D2 15 µM, D3 22,5 µM. Dosis RT + CQ: D1 2,5 Gy + 7,5 µM, D2 5 Gy + 15 µM, D3 7,5 Gy + 22,5 µM.

Respecto a la combinación de radiación ionizante con el inductor de la autofagia LBH589, se observa, como en la combinación previa, en la línea CAL33 no mejora el efecto alcanzado por la RT en monoterapia (Figura 40). De nuevo y aunque no es el objetivo de este trabajo, sí se observa que la combinación mejora el efecto del fármaco individual (Figura 40). Por tanto, en la línea CAL33 no podemos confirmar la hipótesis de que la combinación de RT con un modificador de la autofagia permite mantener el efecto bajando la dosis de irradiación.

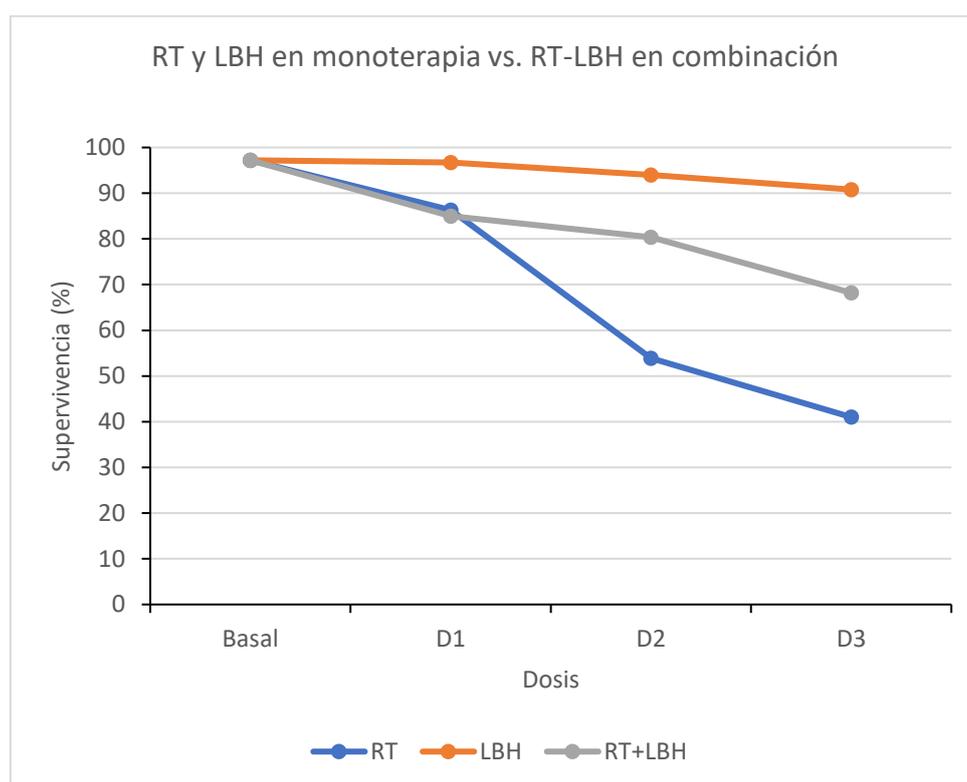


Figura 40. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y LBH589) y su combinación (RT + LBH589) en la línea celular CAL33. RT: radioterapia. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis LBH589: D1 7,5 nM, D2 15 nM, D3 22,5 nM. Dosis RT + CQ: D1 2,5 Gy + 7,5 nM, D2 5 Gy + 15 nM, D3 7,5 Gy + 22,5 nM.

La representación gráfica de la supervivencia celular en la línea CAL33 mediante citometría de flujo se muestra a continuación para los tratamientos combinados de RT más CQ, y RT más LBH589 (Figuras 41 y 42).

La muerte celular secundaria a la combinación de RT más CQ se debe en su mayoría a muerte por apoptosis, sobre todo tardía, y necrosis, aunque el porcentaje de apoptosis temprana aumenta progresivamente también a dosis crecientes (Figura 41).

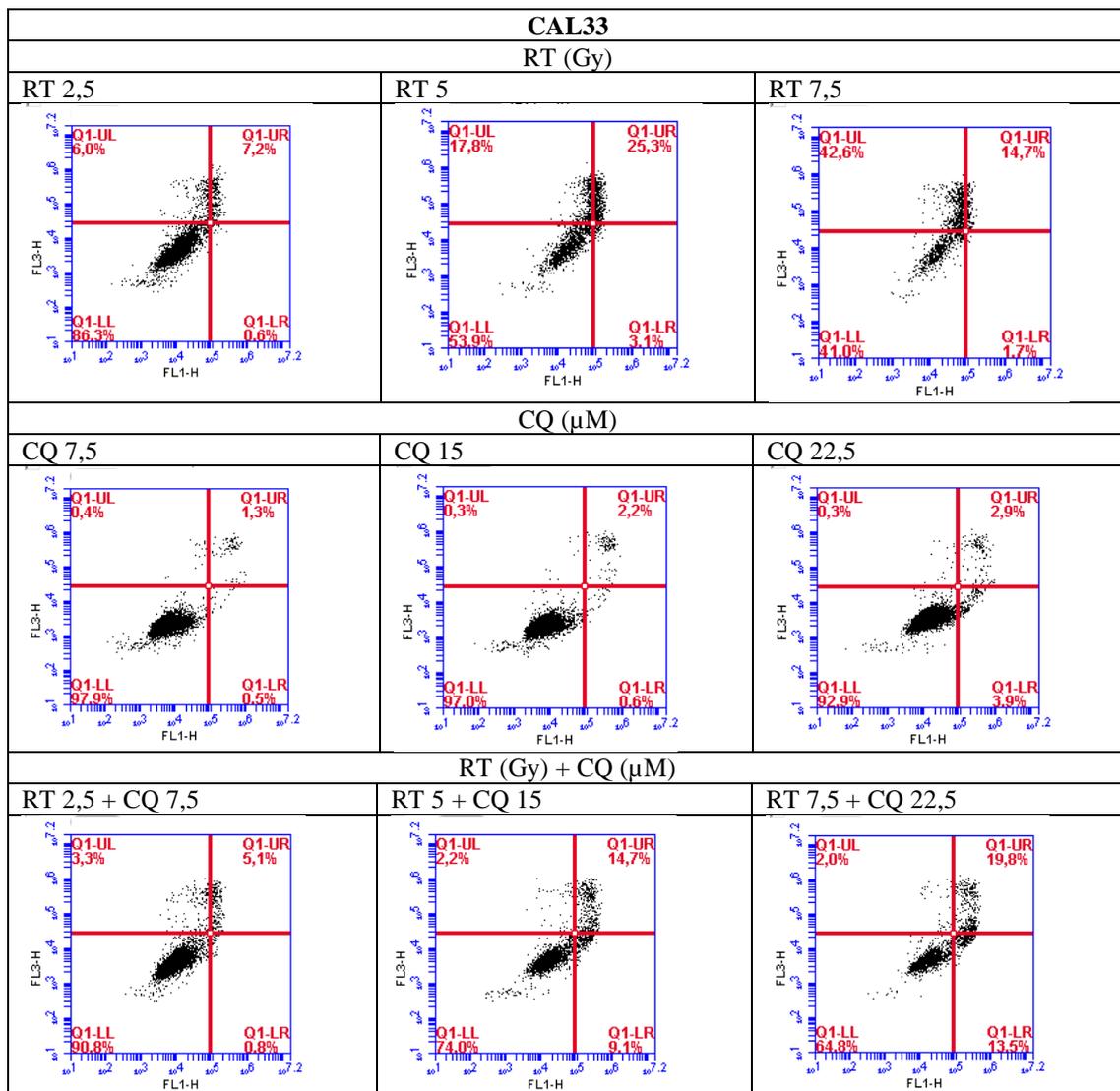


Figura 41. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular CAL33 empleando RT y CQ en monoterapia, así como su combinación RT+CQ. RT: radioterapia. CQ: cloroquina.

Por otro lado, la administración de RT y LBH589 en combinación produce una situación similar observando muerte celular por apoptosis, fundamentalmente tardía y necrosis, con un porcentaje de apoptosis temprana que, en menor medida, también aumenta al aumentar las dosis de la combinación (Figura 42).

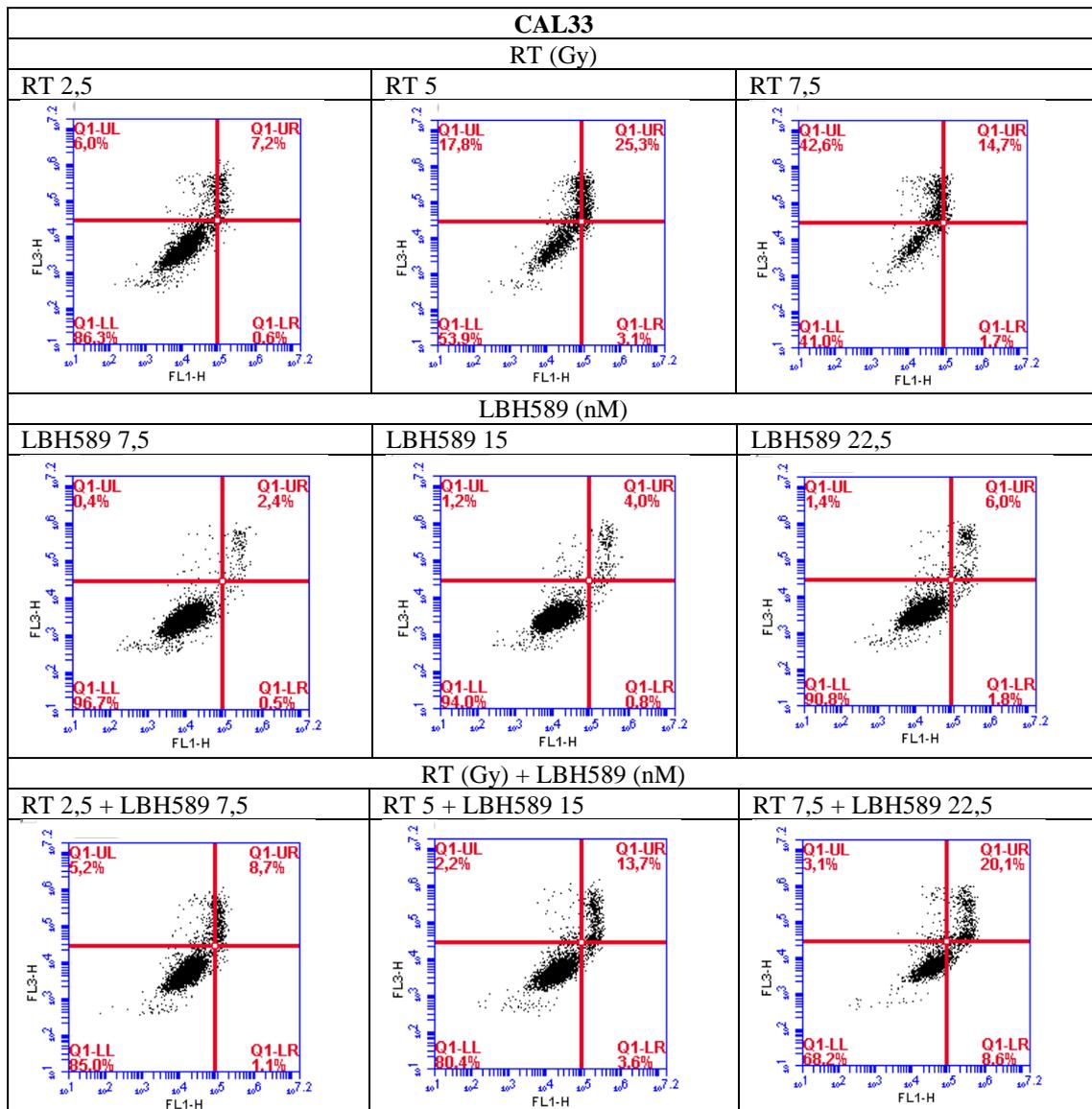


Figura 42. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular CAL33 empleando RT y LBH589 en monoterapia, así como su combinación RT+LBH589. RT: radioterapia. LBH: LBH589.

Utilizando el método *Chou-Talalay* y mediante el índice de combinación (CI), no se confirma que exista efecto sinérgico de la combinación de RT con cualquiera de los dos modificadores de la autofagia, ya que el CI siempre sale mayor a uno definido como efecto antagónico (Tabla 18).

Tabla 18. Análisis mediante el método *Chou-Talalay* en la línea celular CAL33. CI < 1: efecto sinérgico (0,85-0,9: leve; 0,7-0,85: moderado; 0,3-0,7: normal; 0,1-0,3: fuerte). CI > efecto antagónico. CI =1: efecto aditivo. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tratamiento	C-	RT-CQ	RT-CQ	RT-CQ	RT-LBH	RT-LBH	RT-LBH
CQ (µM)		7,5	15	22,5			
LBH (nM)					7,5	15	22,5
RT (Gy)		2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
Supervivencia (%)	97,2	90,8	74	64,8	85	80,4	68,2
Mortalidad (%)	2,8	9,2	26	35,2	15	19,6	31,8
Fa	0,02	0,09	0,26	0,35	0,15	0,19	0,31
CI		1,4	1,5	1,8	1,1	1,9	2,08

También se administró la combinación de RT con ambos modificadores de la autofagia en la línea 32860. En las Figuras 43 y 44 se puede observar la comparación entre la combinación de RT con cada uno de ellos, respecto a los tratamientos simples.

En el caso de RT con CQ, la combinación a dosis bajas no alcanzó mayor efecto que el conseguido por los tratamientos administrados de forma individual. A dosis altas sí se alcanzó mayor efecto que en monoterapia (Figura 43).

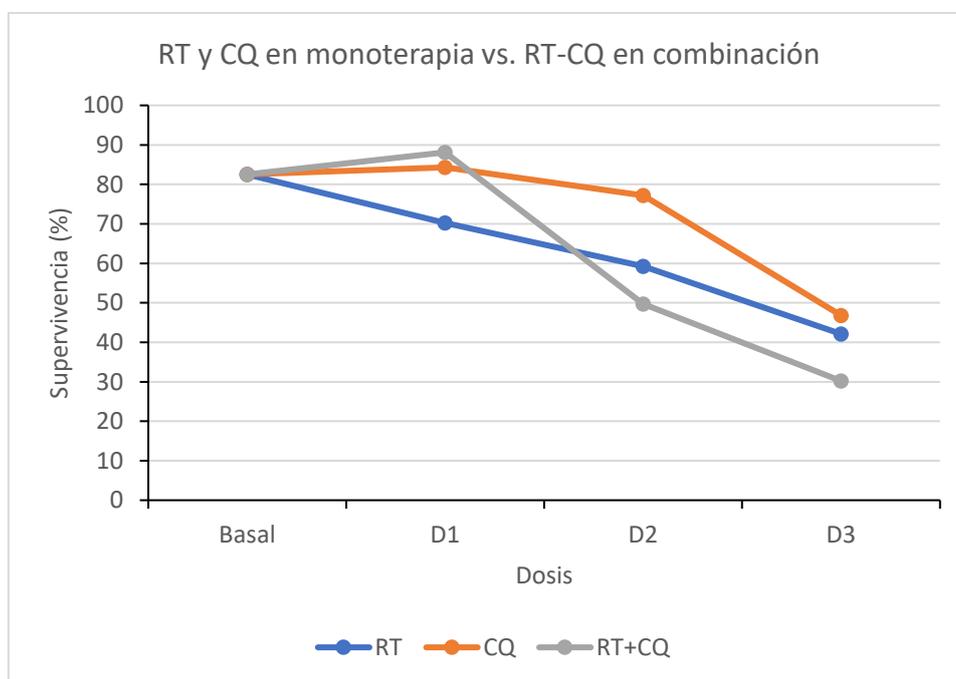


Figura 43. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y CQ) y su combinación (RT + CQ) en la línea celular 32860. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 7,5 µM, D2 15 µM, D3 22,5 µM. Dosis RT + CQ: D1 2,5 Gy + 7,5 µM, D2 5 Gy + 15 µM, D3 7,5 Gy + 22,5 µM.

Respecto a la combinación de RT y LBH589, se observó que, a dosis medias, la combinación alcanzaba un mayor efecto que con RT y LBH589 en monoterapia. A dosis bajas y altas, la adición de RT a LBH589 sí mejora el efecto del fármaco de forma individual, pero fue muy similar al conseguido por RT individual (Figura 44).

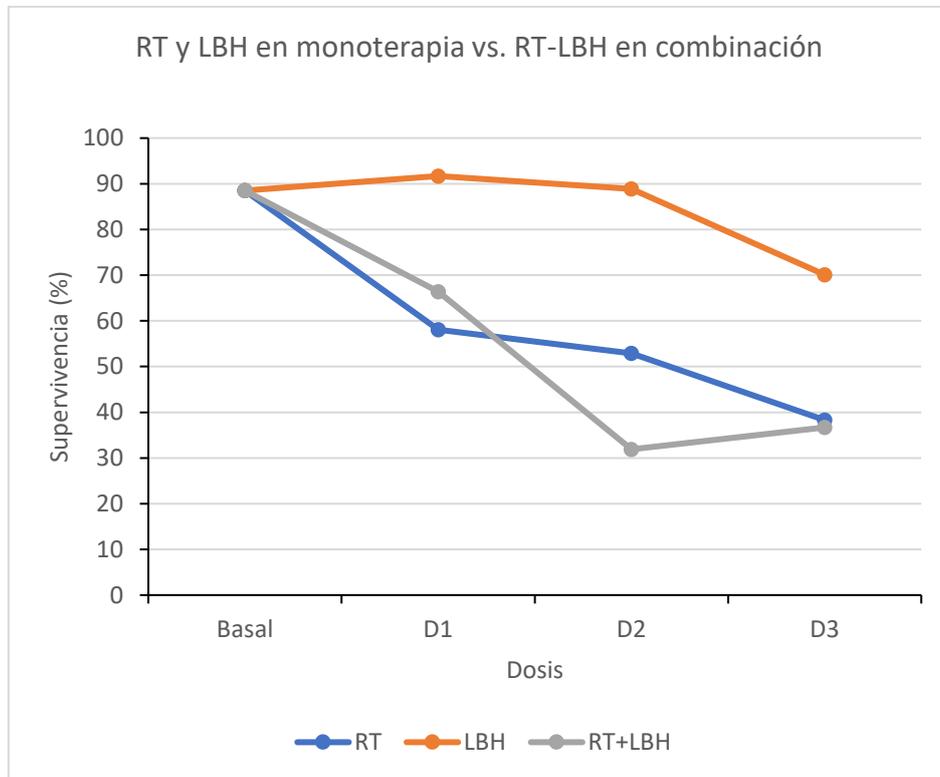


Figura 44. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y LBH589) y su combinación (RT + LBH589) en la línea celular 32860. RT: radioterapia. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis LBH589: D1 7 nM, D2 14 nM, D3 21 nM. Dosis RT + CQ: D1 2,5 Gy + 7 nM, D2 5 Gy + 14 nM, D3 7,5 Gy + 21 nM.

Por tanto, a partir de estos datos, no podemos confirmar nuestra hipótesis en el caso de la línea celular 32860. Sí se puede afirmar que, de manera secundaria, hemos observado que la combinación mejora los resultados de los dos modificadores de la autofagia en monoterapia.

El porcentaje de supervivencia analizado mediante citometría de flujo se muestra representado a continuación para los tratamientos combinados de RT más CQ, y RT más LBH589 para la línea celular 32860 (Figuras 45 y 46).

En esta ocasión, se puede observar que la muerte celular producida con el tratamiento combinado de RT y CQ se debe fundamentalmente a muerte celular por apoptosis, con un peso especial para la apoptosis temprana (Figura 45).

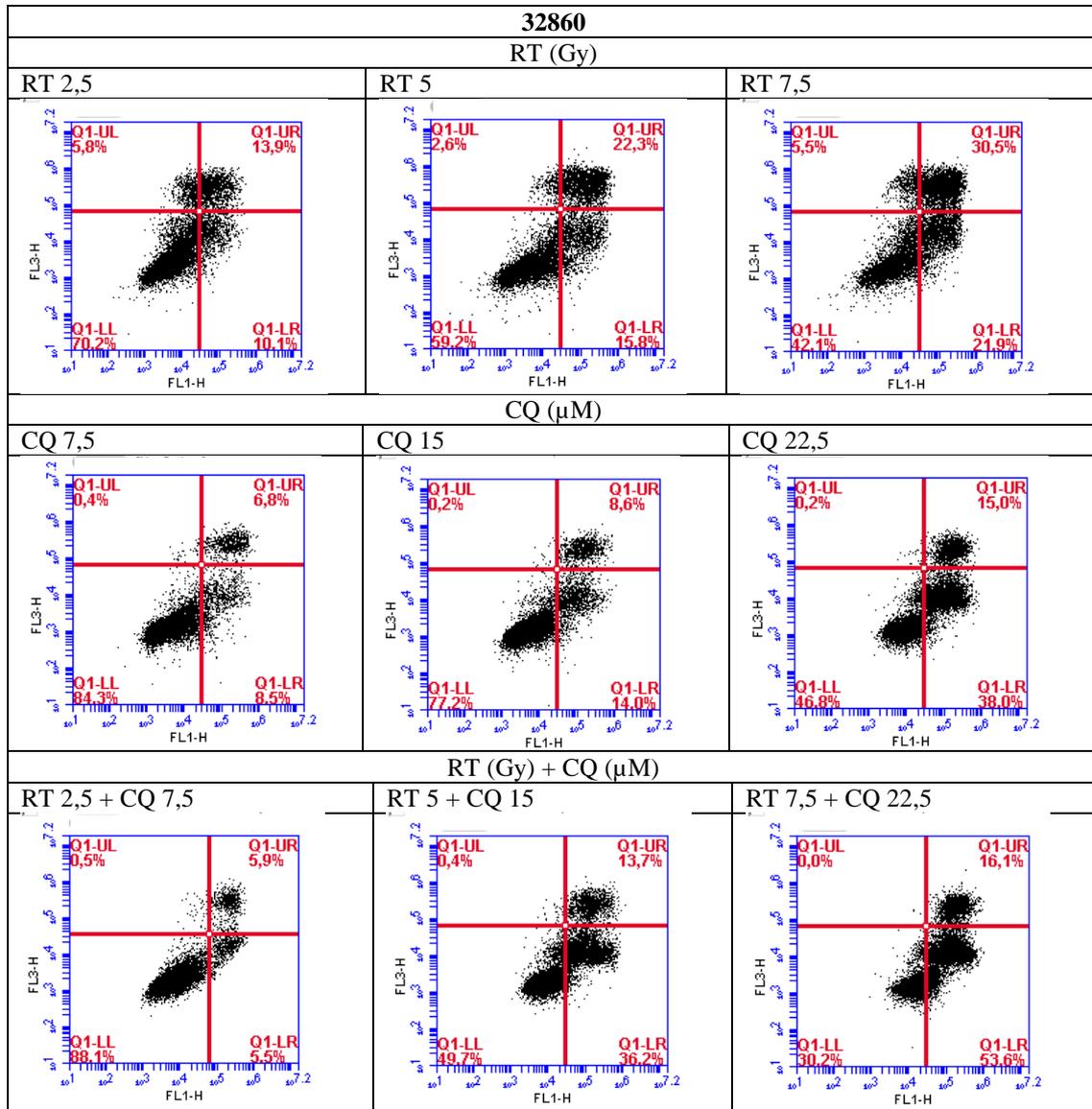


Figura 45. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular 32860 empleando tratamientos en monoterapia de RT y CQ, así como su combinación RT+CQ. RT: radioterapia. CQ: cloroquina.

Respecto a la combinación de radiación ionizante y LBH589, la muerte celular producida se corresponde fundamentalmente con muerte por apoptosis, en esta ocasión, más por tardía y necrosis, con un porcentaje de temprana muy estable (Figura 46).

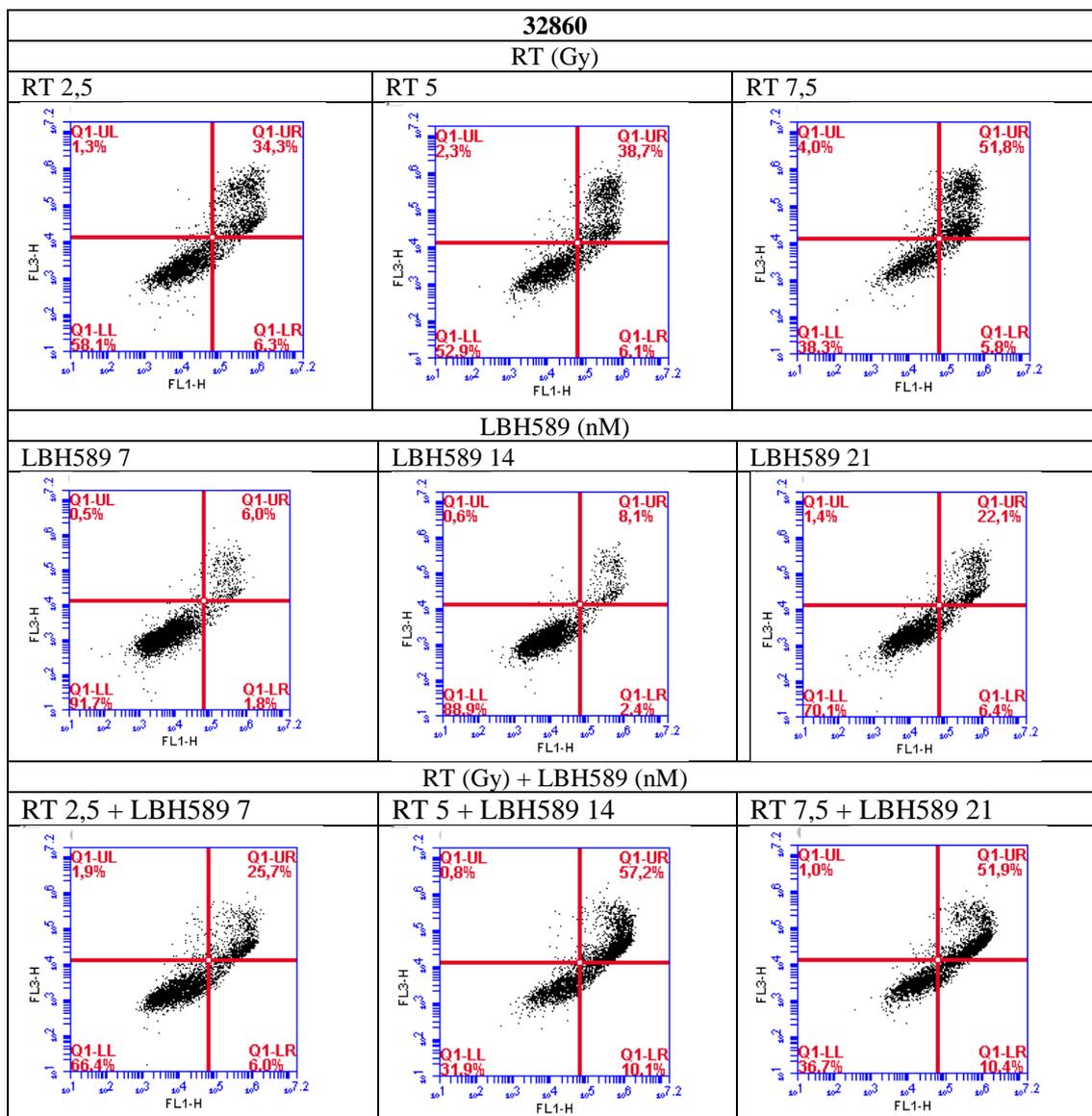


Figura 46. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular 32860 empleando tratamientos en monoterapia de RT y LBH589, así como su combinación RT+LBH589. RT: radioterapia. LBH: LBH589

Utilizando el método *Chou-Talalay* y mediante el índice de combinación (CI), no se observó que el aumento del efecto conseguido de la combinación de RT con CQ a dosis altas, se deba a un efecto sinérgico, ya que el CI es superior a 1 en cualquiera de las tres combinaciones administradas.

Por otro lado, respecto a la combinación de RT y LBH589, vemos que el efecto alcanzado supera al conseguido por el LBH589 en monoterapia y similar al de la RT individual. Sin embargo, teniendo en cuenta el CI observamos que, en la combinación de dosis bajas, el

efecto es antagónico, a dosis medias obtenemos efecto sinérgico y a dosis altas efecto aditivo (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis mediante el método *Chou-Talalay* en la línea celular 32860. CI < 1: efecto sinérgico (0,85-0,9: leve; 0,7-0,85: moderado; 0,3-0,7: normal; 0,1-0,3: fuerte). CI > efecto antagónico. CI =1: efecto aditivo. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tratamiento	C-	RT-CQ	RT-CQ	RT-CQ	RT-LBH	RT-LBH	RT-LBH
CQ (µM)		7,5	15	22,5			
LBH (nM)					7	14	21
RT (Gy)		2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
Supervivencia (%)	82,5	88,1	49,7	30,2	66,4	31,8	36,7
Mortalidad (%)	17,5	11,9	50,3	69,8	33,6	68,2	63,3
Fa	0,17	0,11	0,50	0,69	0,33	0,68	0,63
CI		1,41	1,30	4,68	1,7	0,5	1

### 4.3. Estudio de la línea celular derivada de cáncer de próstata

El estudio de la línea de cáncer de próstata VCAP mostró que se partía de una población de células supervivientes inferior a otras líneas, con un 71% de células vivas en la situación basal. La administración de RT, CQ y LBH589 en monoterapia produjo un aumento progresivo de la muerte celular a medida que se aumentaban las dosis de las tres opciones terapéuticas (Figura 47).

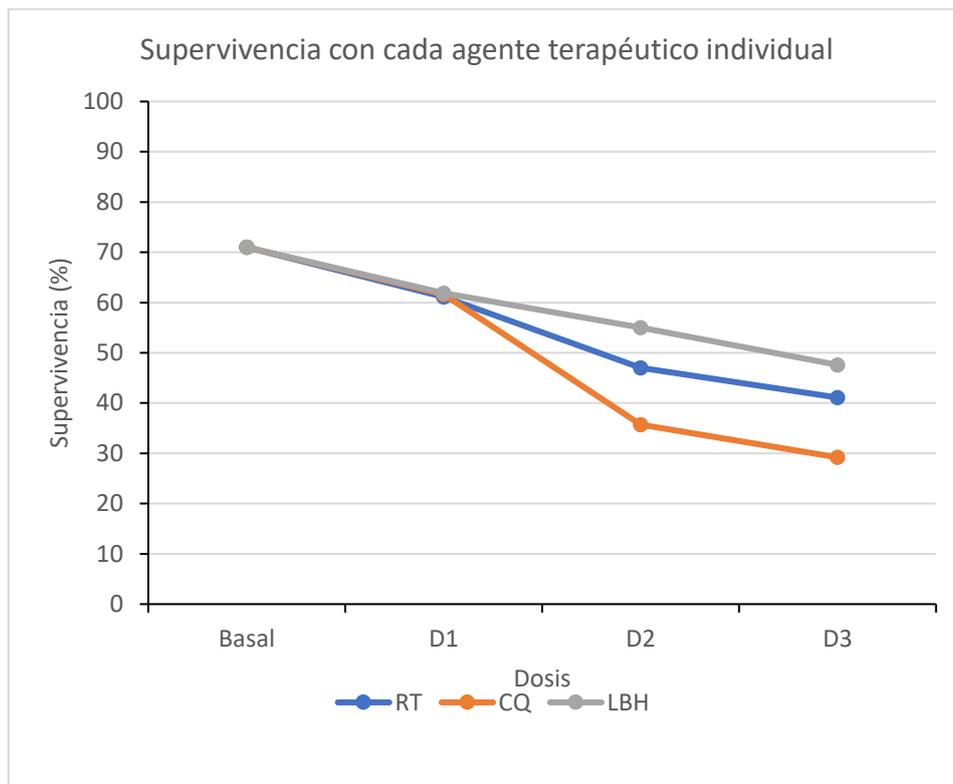


Figura 47. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia en la línea celular VCAP. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5  $\mu$ M, D2 10  $\mu$ M, D3 15  $\mu$ M. Dosis LBH589: D1 2,5 nM, D2 5 nM, D3 7,5 nM.

El porcentaje de supervivencia analizado mediante citometría de flujo se muestra representado a continuación para cada dosis de RT, CQ y LBH589 para la línea VCAP (Figura 48 y Tabla 20).

A diferencia del resto de líneas celulares de este trabajo, en el caso de VCAP se observa un porcentaje mayor de necrosis con cualquiera de los tratamientos administrados si bien las muestras sin tratar también presentaban un mayor porcentaje de células en necrosis en el control. La administración de RT produce muerte celular por apoptosis tardía y

necrosis, con un porcentaje de apoptosis temprana muy estable y un porcentaje alto de necrosis (Figura 48). La administración de CQ y LBH589 produce un mayor porcentaje de apoptosis temprana, aunque sigue predominando la muerte por apoptosis tardía y necrosis (Figura 48).

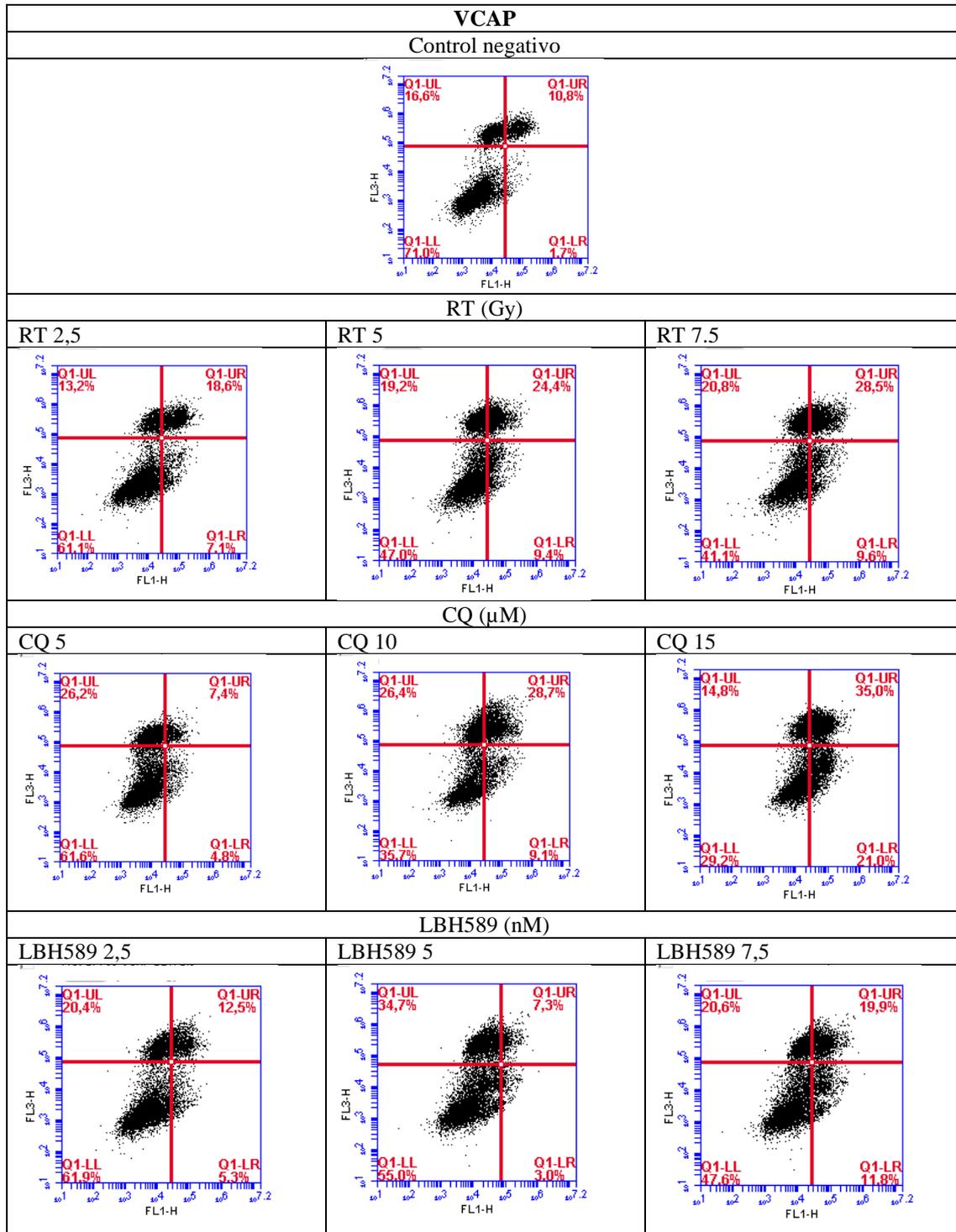


Figura 48. Análisis de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular VCAP empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tabla 20. Porcentaje de supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular VCAP empleando cada agente de forma individual. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tratamiento	C-	RT	RT	RT	CQ	CQ	CQ	LBH	LBH	LBH
CQ (µM)					5	10	15			
LBH589 (nM)								2,5	5	7,5
RT (Gy)		2,5	5	7,5						
Supervivencia (%)	71	61,1	47	41,1	61,6	35,7	29,2	61,9	55	47,6
Mortalidad (%)	29	38,9	53	58,9	38,4	64,3	70,8	38,1	45	52,4
Fa	0,29	0,38	0,53	0,58	0,38	0,64	0,70	0,38	0,45	0,52

El efecto de los dos tratamientos por separado y su combinación se representa a continuación para la línea celular VCAP, tanto para RT y CQ, como RT y LBH589 (Figuras 49 y 50). Se puede observar una disminución de la supervivencia celular más pronunciada en ambas combinaciones que con cada agente en monoterapia.

En la combinación de RT y CQ, se observa un aumento del efecto alcanzado y, por tanto, una disminución de la supervivencia celular en la combinación a dosis bajas. De esta manera, la muerte celular producida por la combinación de dosis bajas (D1) iguala, incluso mejora, el efecto alcanzado por la dosis alta de irradiación (D3) (Figura 49).

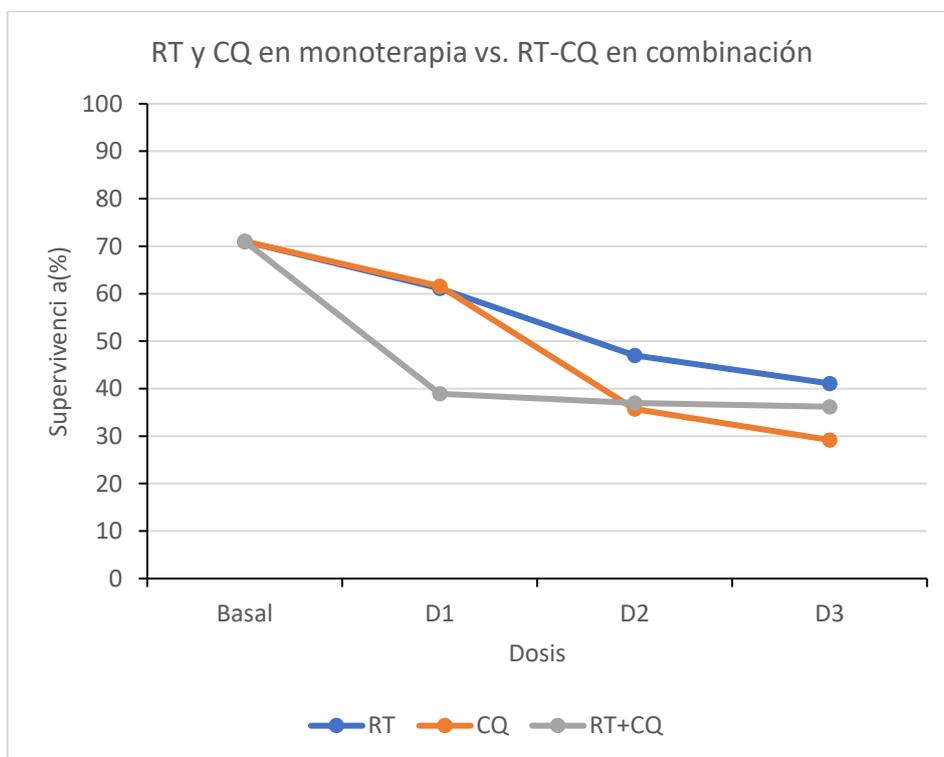


Figura 49. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y CQ) y su combinación (RT + CQ) en la línea celular VCAP. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis CQ: D1 5 µM, D2 10 µM, D3 15 µM. Dosis RT+CQ: D1 2,5 Gy + 5 µM, D2 5 Gy + 10 µM, D3 7,5 Gy + 15 µM.

Respecto al tratamiento combinado de RT y LBH589, la combinación respecto a los ambos tratamientos administrados de forma individual sí consigue un efecto mayor a cualquiera de las dosis empleadas y el efecto alcanzado por las dosis bajas en combinación (D1) es mayor que el alcanzado por las dosis altas de RT individual (D3) (Figura 50).

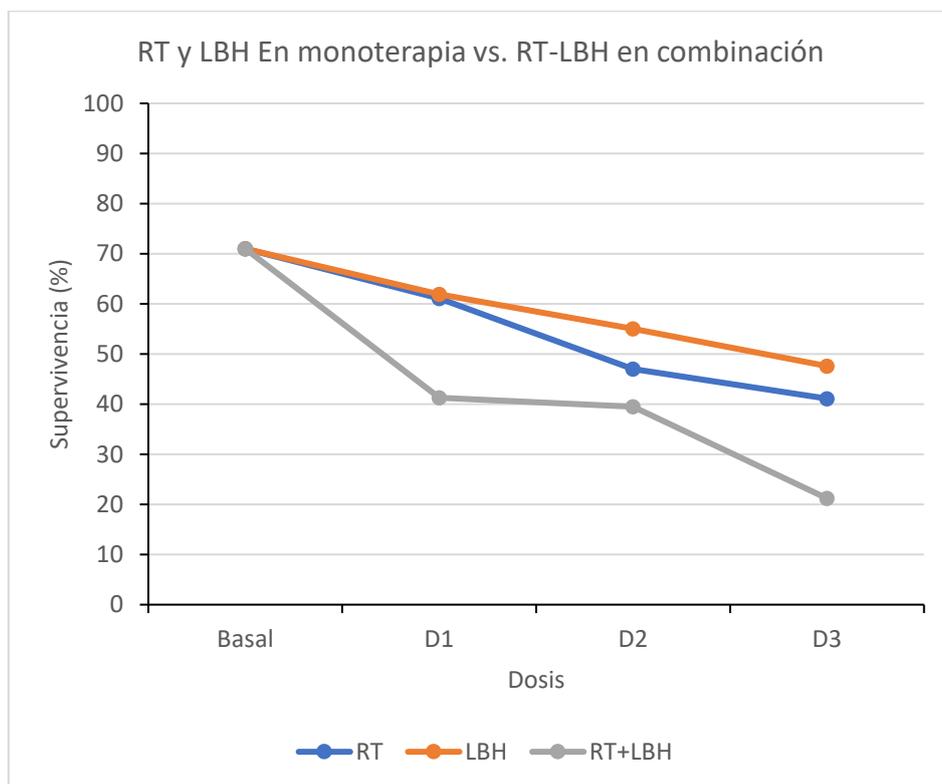


Figura 50. Supervivencia con cada agente terapéutico utilizado en monoterapia (RT y LBH589) y su combinación (RT + LBH589) en la línea celular MDA-MB-231. RT: radioterapia. LBH: LBH589. Dosis RT: D1 2,5 Gy, D2 5 Gy, D3 7,5 Gy. Dosis LBH589: D1 2,5 nM, D2 5 nM, D3 7,5 nM. Dosis RT + LBH589: D1 2,5 Gy + 2,5 nM, D2 5 Gy + 5 nM, D3 7,5 Gy + 7,5 nM.

El porcentaje de supervivencia analizado mediante citometría de flujo se muestra representado a continuación para los tratamientos combinados de RT más CQ, y RT más LBH589 (Figuras 51 y 52).

La muerte celular producida tras la administración del tratamiento combinado RT + CQ se distribuye entre muerte apoptótica y no apoptótica. A dosis altas predomina la muerte celular apoptótica tanto temprana como tardía junto a necrosis. A dosis bajas, el porcentaje de apoptosis tardía y necrosis es mayor y a dosis más altas adquiere mayor importancia la apoptosis temprana (Figura 51).

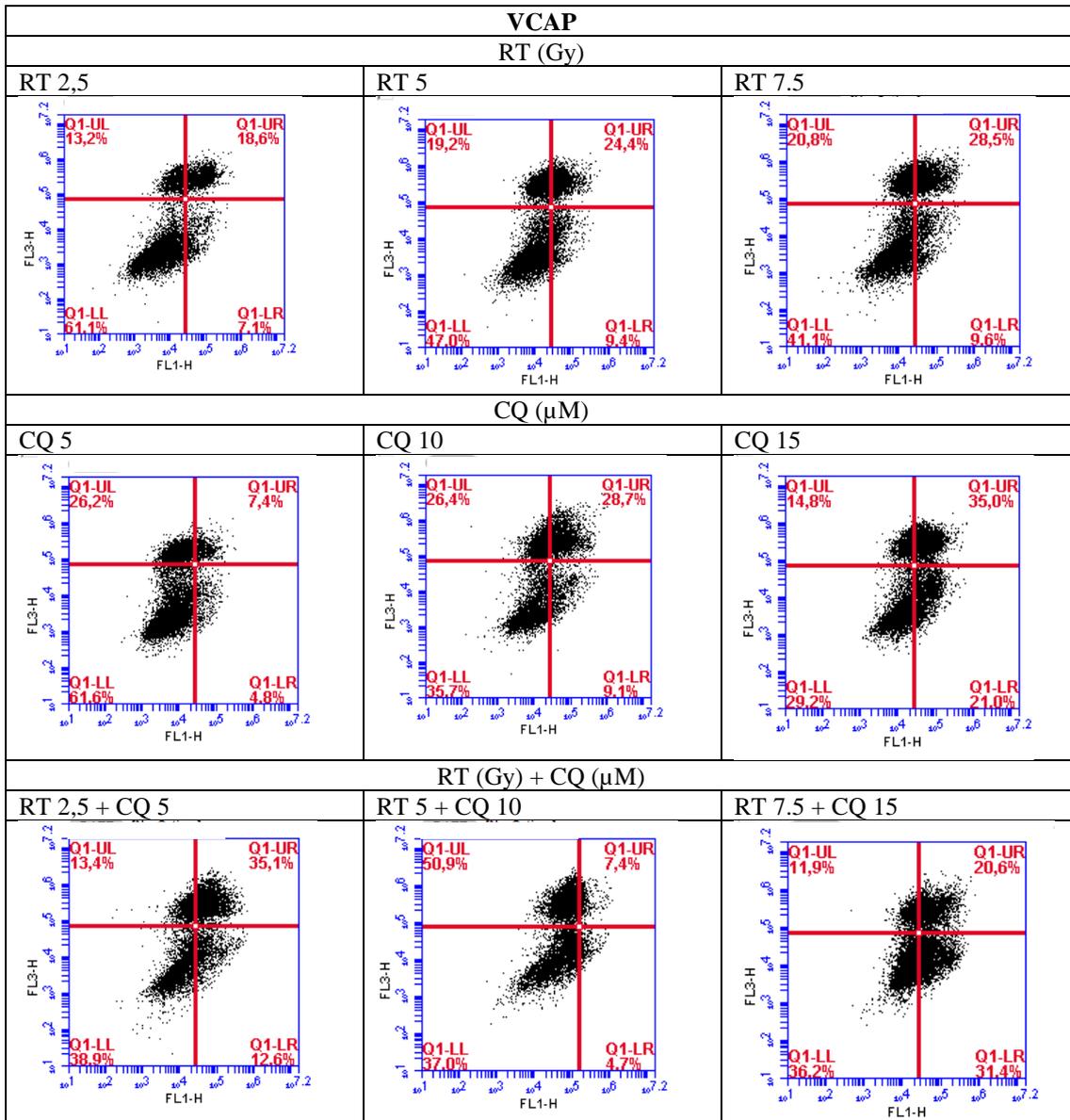


Figura 51. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular VCAP empleando tratamiento en monoterapia de RT y LCQ, así como su combinación RT+CQ. RT: radioterapia. CQ: cloroquina.

La combinación de RT y LBH589 conlleva un aumento de muerte celular que a dosis más altas se corresponde con la muerte apoptótica temprana, así como tardía junto a necrosis adquieren mayor importancia (Figura 52).

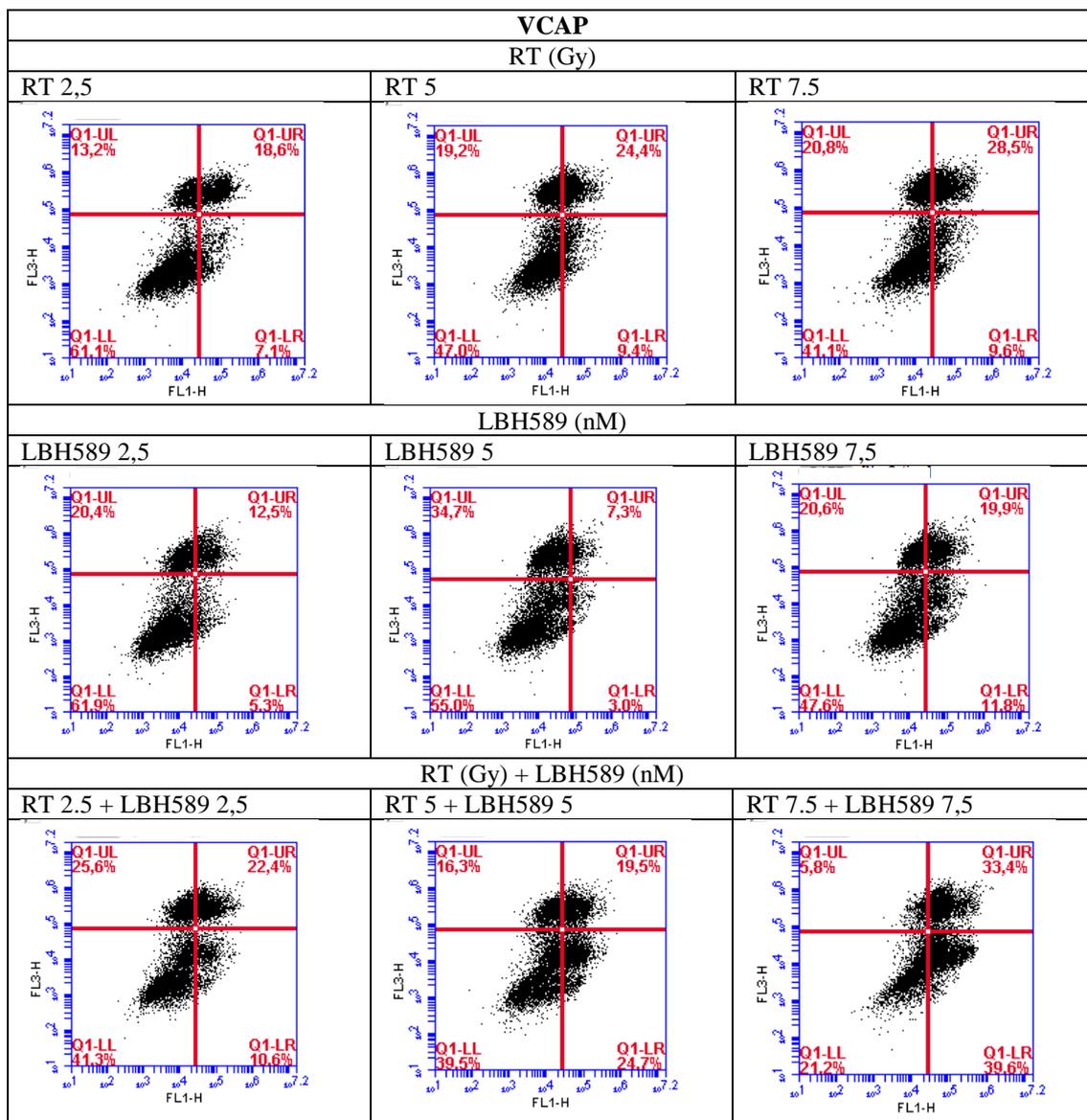


Figura 52. Supervivencia y muerte celulares mediante citometría de flujo en la línea celular VCAP empleando tratamientos en monoterapia de RT y LBH589, así como su combinación y RT+LBH589. RT: radioterapia. LBH: LBH589.

En el caso de esta línea, la combinación de RT y CQ no mejora el efecto producido por los tratamientos individuales. Mediante el método *Chou-Talalay* se comprobó que el CI es superior a 1, es decir, efecto antagónico, para dosis medias y altas; se obtuvo un valor inferior a 1 en las dosis más bajas. Respecto a la combinación de RT y LBH589, el valor de CI fue inferior a 1 en cualquiera de las combinaciones, es decir, el mayor efecto sinérgico de los tratamientos combinados respecto a los individuales alcanzó un efecto sinérgico (Tabla 21).

Tabla 21. Análisis mediante el método *Chou-Talalay* en la línea VCAP si el aumento de efecto tras la administración combinada de RT y CQ, así como RT y LBH589 se debe a un efecto sinérgico. CI < 1: efecto sinérgico (0,85-0,9: leve; 0,7-0,85: moderado; 0,3-0,7: normal; 0,1-0,3: fuerte). CI > efecto antagónico. CI =1: efecto aditivo. RT: radioterapia. CQ: cloroquina. LBH: LBH589.

Tratamiento	C	RT-CQ	RT-CQ	RT-CQ	RT-LBH	RT-LBH	RT-LBH
CQ (µM)		5	10	15			
LBH589 (nM)					2,5	5	7,5
RT (Gy)		2,5	5	7,5	2,5	5	7,5
Supervivencia (%)	71	38,9	37	36,2	41,3	39,5	21,2
Mortalidad (%)		61,1	63	63,8	58,7	60,5	78,8
Fa		0,61	0,63	0,63	0,58	0,6	0,78
CI		0,79	1,45	2,18	0,54	0,96	0,39

#### 4.4. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular MDA-MB-231

Se realizó estudio mediante *Western Blot* para analizar la expresión de proteínas que intervienen en el proceso autofágico (p62, Beclin-1, LC3) en la línea celular MDA-MB-231 que demostró efecto sinérgico en la combinación de RT con ambos modificadores de la autofagia.

El estudio de expresión de la proteína p62 mostró datos similares entre el control y las tres dosis de panobinostat® administradas en monoterapia. En cambio, en los tratamientos combinados de RT y panobinostat® se observa una disminución progresiva de esta proteína según se incrementa la dosis (Figura 53). Respecto a la CQ, los niveles de p62 se mantienen similar en las tres dosis administradas, pero más altos que en el de control. Lo mismo ocurre en la combinación de RT y CQ (Figura 53).

El estudio de expresión de Beclin-1 ha mostrado poca variabilidad en sus niveles para el tratamiento de panobinostat® en monoterapia a las distintas dosis, y su combinación con radioterapia, siendo muy similar al control (Figura 53). En el tratamiento de CQ en monoterapia, se observa una disminución clara de Beclin-1. En la combinación de CQ con RT no se observa esta disminución respecto al control (Figura 53).

El estudio de expresión de la proteína LC3 I y II se encuentra aumentada al recibir tratamiento con panobinostat® en monoterapia respecto al control, sobre todo en la dosis más alta. También está aumentada al recibir la combinación de RT y panobinostat® respecto al control (Figura 53). Al recibir tratamiento con CQ, también se observa un aumento respecto al control tanto en el tratamiento en monoterapia como en la combinación con RT (Figura 53).

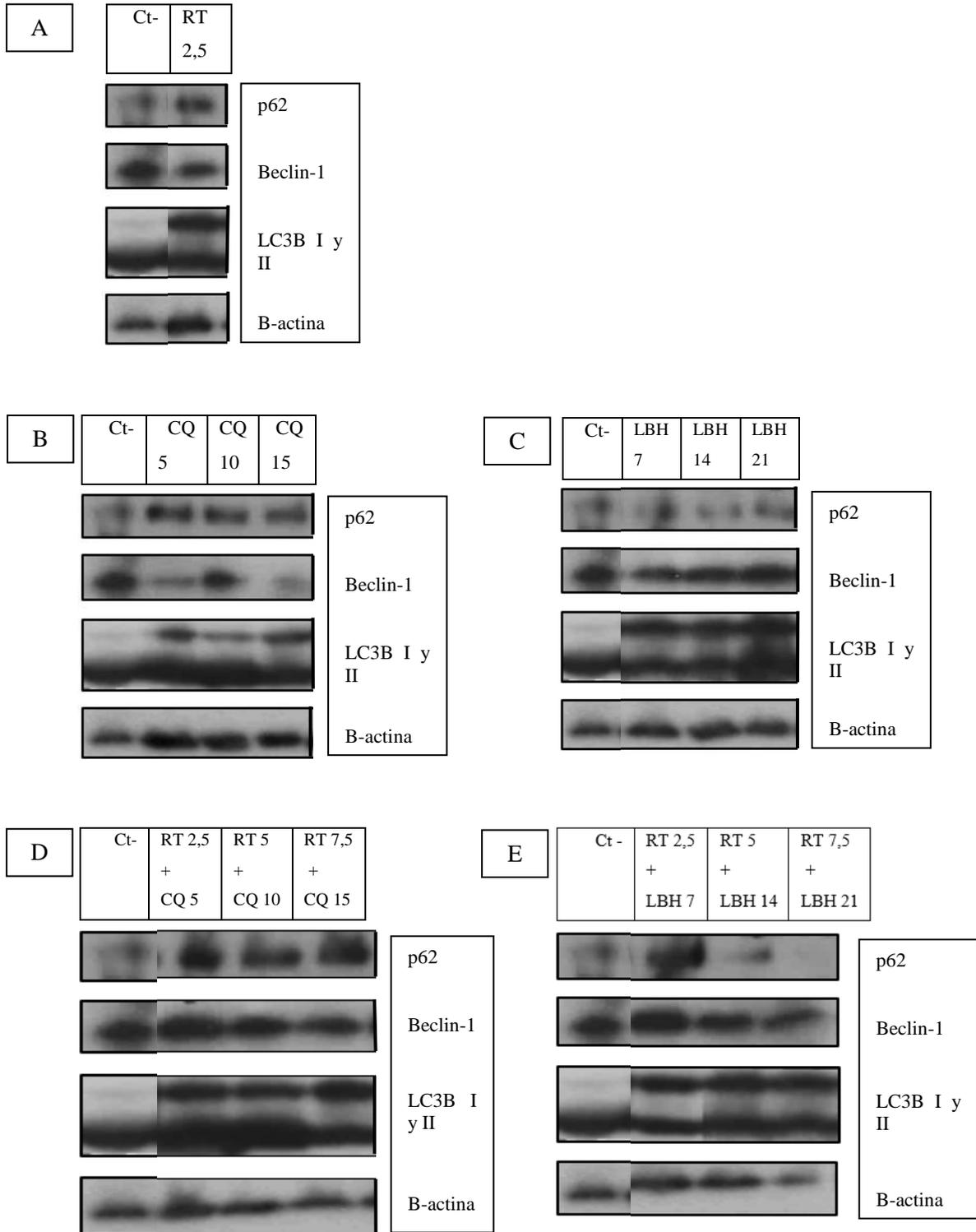


Figura 53. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular MDA-MB-231 mediante *Western-blot*: p62, Beclin-1, LC3 I y II, y B-actina. A. Tratamiento Con RT en monoterapia. B. Tratamiento de CQ y RT en monoterapia. C. Tratamiento de LBH589 y RT en monoterapia. D. Tratamiento combinado de CQ y RT. E. Tratamiento combinado de LBH589 y RT. CQ: cloroquina ( $\mu\text{M}$ ). RT: radioterapia (Gy). LBH: panobinostat® (nM).

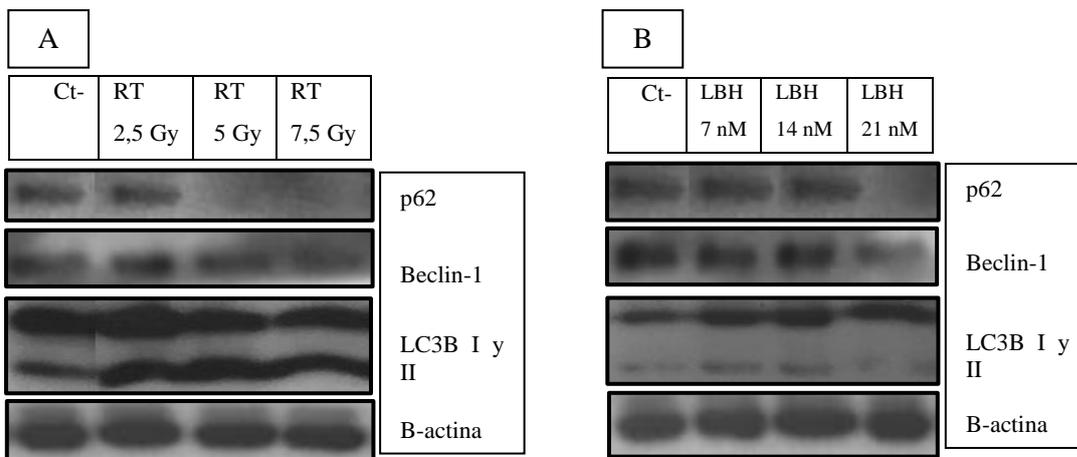
#### 4.5. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular VCAP

Se realizó estudio mediante *Western Blot* para analizar la expresión de proteínas que intervienen en el proceso autofágico (p62, Beclin-1, LC3) en aquellas líneas celulares en las que se obtuvo efecto sinérgico tras la combinación RT y modificadores de la autofagia. Por los datos presentados previamente, se llevó a cabo en la línea celular de cáncer de próstata VCAP. Como control de carga se empleó la proteína  $\beta$ -actina. Los resultados obtenidos en la línea celular VCAP se muestran a continuación.

El estudio de expresión de la proteína p62 mostró una disminución progresiva de esta proteína a medida que se aumentaba la dosis de panobinostat® y RT en monoterapia, así como en la combinación de ambos respecto al control (Figura 54).

El estudio de expresión de la proteína Beclin-1 no mostró grandes diferencias entre el control y la administración de RT. Las dosis más altas de LBH589 en monoterapia y en combinación con RT sí produjo una disminución de dicha expresión (Figura 54).

El estudio de expresión de las proteínas LC3 I y II mostró estabilidad en el tratamiento de panobinostat® en monoterapia, un ligero aumento con RT en monoterapia, y un aumento más marcado en el tratamiento combinado de RT y panobinostat®, respecto al control (Figura 54).



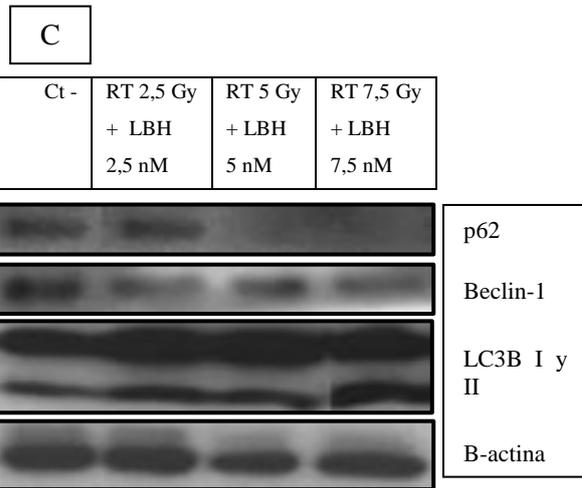


Figura 54. Estudio de la expresión de proteínas relacionadas con la ruta de autofagia en línea celular VCAP mediante *Western-blot*: p62, Beclin-1, LC3 I y II, y B-actina. A. Tratamiento de RT en monoterapia. B. Tratamiento de LBH589 en monoterapia. C. Tratamiento combinado de LBH589 y RT. CQ: cloroquina. RT: radioterapia. LBH: panobinostat®.



## ***5. DISCUSIÓN***

El cáncer es una enfermedad con una incidencia y prevalencia que van en aumento en nuestro medio (6). El manejo de cualquier tumor requiere un equipo multidisciplinar para ofrecer un tratamiento individualizado basándose en diversos factores tanto del tumor como del paciente. Las opciones de tratamiento incluyen cirugía, RT y tratamientos sistémicos (quimioterapia, hormonoterapia, terapia dirigida e inmunoterapia). Es fundamental desarrollar estrategias terapéuticas que nos permitan ofrecer mejores resultados a nuestros pacientes en la práctica clínica diaria.

La RT es un tratamiento antitumoral cuyo beneficio está bien establecido en multitud de estrategias terapéuticas. La radiación ionizante produce un daño en el ADN y provoca un estrés en el retículo endoplasmático, capaces de inducir la autofagia en las células tumorales como mecanismos de defensa (37,151,235–239). Modificar esta vía puede ayudar a mejorar los resultados obtenidos por la RT.

La autofagia es un proceso con un papel fundamental en la viabilidad y homeostasis celulares. Alteraciones en cualquier punto del proceso se relacionan con el desarrollo de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer. Se conoce su papel como supresor tumoral, de ahí que alteraciones en esta vía se asocien a progresión tumoral. Paradójicamente la autofagia también puede contribuir a la progresión tumoral en determinadas condiciones, ya que esta ruta puede funcionar como mecanismo de supervivencia en situaciones de escasez de nutrientes y oxígeno (84,91,240,241).

Son múltiples los mecanismos moleculares que hacen posible la autofagia. El conocimiento de los mismos, así como del papel dual de la autofagia en el cáncer ha permitido plantear tratamientos que modulen el proceso de la autofagia con el objetivo de obtener un beneficio terapéutico. Ejemplos de modificadores de la autofagia son el panobinostat® o LBH589 y la CQ. El LBH589 actúa como un inductor de la autofagia. En cambio, el tratamiento con CQ produce una inhibición o bloqueo de este proceso.

Este trabajo se ha centrado en analizar el efecto individual de RT, LBH589 y CQ, así como la combinación de RT con ambos moduladores de la autofagia en varias líneas celulares de tumores de mama (MDA-MB-231, HCC-1937), cabeza y cuello (CAL33, 32860) y próstata (VCAP). Para ello se ha determinado la viabilidad y muerte celular. Además, se ha analizado si el efecto alcanzado en los tratamientos combinados es

sinérgico, aditivo o antagónico. Por último, en caso de demostrar sinergia entre radiación ionizante y alguno de los modificadores de la autofagia se han analizado las proteínas relacionadas con la autofagia: p62, Beclin-1, LC3 I y II con el fin de determinar si se asocia con cambios en este proceso.

### 5.1. Tratamientos individuales en las líneas celulares de cáncer de mama, cabeza y cuello, y próstata

En una primera fase del trabajo se administró de manera individual RT, LBH589 y CQ a dosis progresivamente superiores en las 5 líneas celulares analizadas. A las 72 y 96 horas se evaluó el efecto citotóxico y, posteriormente, la expresión de diversas proteínas relacionadas con la autofagia.

#### 5.1.1. Radioterapia

El cáncer de mama es un tumor con un gran impacto en nuestra sociedad. Son varios los estudios que analizan la relación entre RT y autofagia. Se sabe que la autofagia puede ayudar a la supervivencia celular en diversos tumores como mecanismo de resistencia, de ahí que el control de la autofagia puede ayudar a mejorar los resultados de la RT (142,149,239,242). Las dos líneas de cáncer de mama analizadas MDA-MB-231 y HCC-1937 recibieron RT a dosis de 2,5, 5 y 7,5 Gy demostrando una disminución de la supervivencia celular proporcional al aumento de dosis de RT. En la línea HCC-1937 se observó una disminución de la supervivencia celular más pronunciada a dosis altas que en la línea celular MDA-MB-231. Varios grupos han descrito la línea MDA-MB-231 como relativamente radiorresistente, lo que podría explicar el menor aumento en la muerte celular obtenido en el presente trabajo tras el tratamiento comparado con la línea HCC-1937 (239,243,244). Estas diferencias pueden deberse a la variante histológica o las características moleculares que incluyen mutaciones, cambios epigenéticos y alteraciones cromosómicas, de cada una de las líneas celulares, entre ellas que HCC-1937 presente la mutación en *BRCA1* que conlleva una alteración en los mecanismos de reparación, así como a la presencia de la mutación en *RAS*, y *TP53* de la línea MDA-MB-231 asociadas a un estado de radiorresistencia (245–253). Asimismo, en otros estudios también se ha observado que el tratamiento con RT disminuye la viabilidad de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (236,249). Recientes estudios han observado que tumores con la

mutación *RAS*, *TP53* y *BRAF* activan la vía de la autofagia como mecanismo de resistencia (254,255).

En el presente trabajo se ha analizado el tipo de muerte celular que se producía tras la administración de tratamientos distinguiendo entre muerte apoptótica, ya sea temprana o tardía, y no apoptótica, representado por necrosis. En las líneas de cáncer de mama se observa que aumenta el porcentaje total de muerte celular a medida que se aumenta la dosis de irradiación, tanto apoptosis temprana como tardía junto a necrosis, como han descrito otros grupos (42,256).

Los tumores de la cavidad oral suponen un porcentaje muy importante dentro de los tumores de cabeza y cuello. El tratamiento se basa en la cirugía y la RT con intención radical según la estadificación, empleando tratamiento sistémico con el fin de aumentar sensibilidad de las células tumorales frente a la radiación ionizante. El tratamiento de las dos líneas celulares correspondientes a tumores de cabeza y cuello utilizadas en el presente trabajo, CAL33 y 32860, mostró un aumento progresivo de la muerte celular a medida que aumenta la dosis de radiación ionizante administrada. Estos datos coinciden con lo publicado por distintos trabajos como el de Wu *et al.* en el que se observó como la administración de radiación ionizante a líneas celulares de carcinoma escamoso de cavidad oral disminuyó la viabilidad celular (143).

En esta ocasión, el tipo de muerte observado en la línea CAL33 se reparte entre muerte apoptótica y no apoptótica, siendo mayor el porcentaje de apoptosis tardía y necrosis. Por otro lado, en la línea celular 32860 se observa que el porcentaje de muerte celular progresivamente incluyendo muerte apoptótica y necrótica.

El cáncer de próstata tiene una alta incidencia y prevalencia en la población. Las opciones de tratamiento con intención radical son la cirugía y la RT. Analizar la sensibilidad frente a la RT puede ayudar a mejorar la efectividad de los tratamientos (242,257). La línea celular de cáncer de próstata VCAP recibió las mismas dosis de RT que el resto de las líneas celulares incluidas en el presente trabajo, observándose que se trataba de una de las líneas que muestra mayor sensibilidad a la radiación ionizante de las empleadas en este trabajo (SF<sub>2</sub>=0,61). Esta línea celular presenta la mutación *TP53*-*ERG* que favorece la progresión tumoral y es capaz de interferir en la respuesta a la radiación

ionizante aumentando el daño en el ADN tras la administración de RT. (258–261). El hecho de partir de un menor número de células vivas puede deberse a una cuestión de espacio y nutrientes al ser una línea muy proliferante. No obstante, a las 72 horas de administrar radiación ionizante a dosis crecientes se evidenció un mayor porcentaje de muerte celular, tanto apoptosis como necrosis. Los datos publicados por otros grupos demuestran el aumento de la muerte celular en diversas líneas de cáncer de próstata tras la administración de radiación ionizante (262,263).

Como se ha comentado previamente, la administración de radiación ionizante actúa como un agente estresante que desencadena la autofagia como mecanismo de protección, pudiendo actuar como mecanismo de radioresistencia (268). Al igual que lo publicado por otros grupos, se ha analizado la expresión de algunas de las proteínas relacionadas con la autofagia. La proteína p62 es la principal molécula receptora que interviene en el reconocimiento del material que se degrada en la autofagia selectiva (59,269). El aumento de su expresión significa una inhibición o bloqueo del proceso de la autofagia (58,59,149,270–272). En el análisis de la proteína p62 en las líneas celulares MDA-MB-231 y VCAP se observa que su expresión estaba disminuida respecto al control tras administrar radiación ionizante y, además, este descenso se correlaciona con el aumento de la dosis. En distintos trabajos, se ha descrito que el tratamiento con RT provoca un aumento en el proceso de autofagia evidenciando, por tanto, una disminución en la expresión de la proteína p62 y un aumento de la formación de autofagosomas (143,239). Estos datos sugieren un incremento de la autofagia en respuesta a la RT en estas dos líneas celulares.

Otra de las proteínas analizadas es Beclin-1 que participa en la formación del complejo PI3K de clase III y en la inducción del fagóporo y cuya expresión se mide para analizar los niveles de autofagia (47,50,52,53,60–63). Dependiendo de las proteínas con las que forma complejos, Beclin-1 es capaz de regular la autofagia de forma positiva o negativa (66,69). En situaciones en las que existe mayor nivel de autofagia, generalmente se debería observar un aumento de esta proteína. En el presente estudio, la expresión de Beclin-1 no mostró diferencias de expresión apreciables respecto al control. Esto puede deberse a que se esté produciendo una alta tasa de degradación del autofagosoma, de modo que la proteína no se acumula. No obstante, con este trabajo no se puede asegurar, siendo necesarios experimentos complementarios.

Por su parte, la proteína LC3, con sus dos formas, I y II, participa en la elongación del fagóporo. LC3 I es la forma citosólica que se conjuga y forma LC3 II que se asocia al autofagosoma para participar en su elongación y maduración (19,27,75–77,273,47,52,53,62,71–74). Una vez maduro, LC3 II se degrada y vuelve al citoplasma como LC3 I (47,52,151,53,62,78–83). La proteína LC3 se ha identificado como el marcador más específico y preciso de la autofagia (274,275). El estudio de expresión de las proteínas LC3 I y II en la línea celular MDA-MB-231 muestra que ésta aumenta tras RT en monoterapia, especialmente en el caso de la forma I. Por otro lado, en el análisis de estas proteínas en la línea celular VCAP, mostró un aumento tras tratamiento con RT de las formas LC3 II y LC3 I respecto al control. Es decir, se está formando autofagosoma y se está llevando a cabo la degradación del contenido seleccionado. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios en los que tras el tratamiento con RT se observa un aumento del nivel de LC3 II, lo que se relaciona con un mayor número de autofagosomas (236,257). Por lo tanto, esta observación refuerza la hipótesis de que la RT aumenta la autofagia.

#### 5.1.2. Panobinostat®/LBH589 y CQ

El panobinostat® o LBH589 es un ácido hidroxámico dentro del grupo de los HDACi (218,276). Las proteínas HDAC parecen tener un papel importante en el inicio y progresión tumoral, dado que la pérdida de la acetilación es común en los estadios tempranos de la tumorigénesis, de ahí que los HDACi se hayan convertido en dianas terapéuticas (200,239,277,278). El panobinostat® produce un efecto citotóxico potente en las células tumorales mediante aumento de la apoptosis mediada por mitocondrias y mediante la autofagia independiente de caspasas, pero no es tan tóxico para las células normales (218,279). Son múltiples los escenarios tumorales en los que se ha comprobado su eficacia, ya sean tumores hematológicos o sólidos (280–282). El panobinostat®, como inductor de la autofagia, produce una reducción en la expresión de la proteína p62, que es degradada en el proceso autofágico, y un aumento de la forma conjugada LC3-II y Beclin-1 (270,272,283). Por otro lado, se ha descrito que el fármaco panobinostat® produce un bloqueo en la fase G2/M del ciclo celular (220). Como ya se ha dicho previamente, las células son más radiosensibles cuando se encuentran precisamente en esa fase, la G2/M (133). Por tanto, el tratamiento con panobinostat® favorecería la respuesta de las células frente a la radiación ionizante.

La CQ es un agente cuya forma protonada queda atrapada dentro de las vesículas/lisosomas acidificando el medio de las mismas impidiendo así que se forme el autofagolisosoma actuando como un inhibidor de la autofagia (42,56,222–225,284–286). Dentro de sus aplicaciones se ha visto que tiene efecto citotóxico por sí mismo pero que, además, en combinación con otros agentes terapéuticos actúa como un sensibilizante potenciando el efecto de éstos. A nivel del proceso autofágico, las proteínas que presentan una expresión aumentada son las que intervienen en etapas anteriores a la formación del autofagolisosoma, entre ellas p62 (270,272,287–289). Por ello, aunque Beclin-1 se relaciona con una autofagia activada y lo esperable sería encontrarla con una expresión disminuida, también podemos ver un incremento de expresión debido a la acumulación que supone el bloqueo de la formación del autofagolisosoma.

En el presente trabajo se ha observado que la línea celular MDA-MB-231 es parcialmente sensible a la CQ (dosis 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) con un leve aumento de la muerte celular con el aumento progresivo de la dosis de este fármaco, existiendo una distribución similar entre apoptosis temprana y apoptosis tardía junto a necrosis. Por otro lado, LBH589 (7, 14 y 21 nM) produce una disminución más pronunciada de la supervivencia celular a medida que se aumenta la dosis del inductor de la autofagia produciendo una muerte celular tanto apoptótica como no apoptótica.

En el caso de la línea celular de cáncer de mama, HCC-1937, el presente trabajo demuestra una mayor sensibilidad al efecto producido por CQ (dosis 5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ), con un aumento progresivo de la muerte celular, notablemente más marcado a dosis altas. En cambio, el tratamiento LBH589 (7, 14 y 21 nM) no indujo un aumento de la muerte celular, ni apoptótica ni no apoptótica, a pesar de aumentar la dosis de este fármaco, manteniendo una supervivencia celular similar con las tres dosis empleadas.

Respecto a las dos líneas celulares de tumores cabeza y cuello también se observan diferencias entre ellas. Por un lado, CAL33 demostró ser muy resistente al efecto de CQ y LBH589 administrados de forma individual, a pesar del aumento de las dosis administradas respecto a las empleadas en otras líneas celulares (dosis CQ 7,5, 15 y 22,5  $\mu\text{M}$ ; dosis LBH589 7,5, 15 y 22,5 nM). Por otro lado, la línea celular 32860 mostró una mayor sensibilidad a la CQ que la línea CAL33, si bien se necesitaron dosis superiores a

las empleadas en las líneas de cáncer de mama (7,5, 15 y 22,5  $\mu\text{M}$ ), observándose muerte celular sobre todo tipo apoptótica. En el caso del LBH589, se observó una mayor citotoxicidad (apoptosis principalmente) que en las líneas celulares de mama empleando las mismas dosis (7, 14 y 21 nM). Por tanto, esta última línea precisa dosis más elevadas de CQ para ver un efecto en cuanto a muerte celular y sí se ve un efecto citotóxico cuando se administra LBH589 a las dosis habituales empleadas en este trabajo.

Las diferencias observadas frente a estos dos modificadores de la autofagia en monoterapia podrían ser explicadas, como ya se expuso previamente a propósito de la RT, por las diferencias moleculares e histológicas entre las líneas celulares. Algunas de estas diferencias están caracterizadas para cada una de las líneas celulares (descritas en *Material y Métodos*) y otras que aún no están descritas, intervendrán en diversas vías de muerte celular variando la respuesta frente a los tratamientos. En el caso de las dos líneas de cáncer de mama, existe una diferencia en cuanto al estado de *BRCA1*. Además, la línea celular MDA-MB-231 se corresponde con un adenocarcinoma metastásico, mientras que la línea HCC-1937 lo hace con un carcinoma epitelial ductal infiltrante localizado, de modo que la primera podría tratarse de una línea más agresiva en esta fase de la enfermedad, capaz de desarrollar mecanismos de resistencia frente a los tratamientos con más facilidad, que también podrían surgir en fases más avanzadas de la línea HCC-1937. Por otro lado, las dos líneas de cabeza y cuello se corresponden con carcinomas escamosos, pero solo conocemos el estadio y la presencia de VPH para una de ellas, siendo un factor que podría influir en la respuesta al tratamiento.

Por último, la línea celular VCAP de cáncer de próstata demostró sensibilidad frente a CQ utilizando las mismas dosis que en las líneas de cáncer de mama (5, 10 y 15  $\mu\text{M}$ ) con una disminución progresiva de la supervivencia celular a medida que se aumenta la dosis predominando muerte celular por apoptosis tardía y necrosis, aunque también existe apoptosis temprana. Esta línea se mostró especialmente sensible al efecto de LBH589, de modo que, para mantener la viabilidad celular suficiente a las 72 horas posteriores al tratamiento, tuvo que disminuirse la dosis administrada de manera considerable (2,5, 5 y 7,5 nM) respecto a las dosis empleadas en el resto de las líneas celulares.

En distintos trabajos se ha estudiado el efecto del tratamiento con CQ en la viabilidad celular. El grupo Jiang *et al.* analizó el efecto de la CQ en distintas líneas celulares de

cáncer de mama. El tratamiento con CQ disminuía la viabilidad celular de forma dosis y tiempo dependientes al igual que inducía apoptosis por la vía mitocondrial (221,290). Este grupo propone que las diferencias en la respuesta a CQ de diferentes líneas de cáncer de mama se deben a características individuales de cada línea, como por ejemplo la presencia o no de receptores hormonales positivos. En este sentido, los presentes resultados con MDA-MB-231 demuestran un efecto relativo, siendo HCC-1937 mucho más sensible, aunque esta última tampoco expresa receptores hormonales. En otros estudios, se analizó el efecto de la CQ en líneas celulares de cáncer de pulmón, glioblastoma o hepatocarcinoma, observando unos resultados similares a los obtenidos en las líneas de cáncer de mama: disminución de la viabilidad celular, inhibición de la autofagia e inducción de la apoptosis vía mitocondrial tiempo y dosis dependiente (291–296).

En el caso del tratamiento con LBH589, en distintos estudios se ha comprobado su efecto sobre la proliferación celular con una alta sensibilidad e inhibición del crecimiento tras el tratamiento con este fármaco, tanto en líneas celulares derivadas de tumores hematológicos como sólidos (217,267,303–306,280,281,297–302). Algunos grupos también han comprobado en diversas líneas celulares que el panobinostat® inducía la muerte celular a través de la apoptosis (267,299,301,303,304,307), concretamente el grupo de Jeon *et al.* trabajó con líneas de carcinoma escamoso de cavidad oral (307), mientras que Xiao *et al.* en líneas de cáncer de próstata (267) manteniendo una relación dosis y tiempo dependiente. Por otro lado, Mosleh *et al.* además de tener los mismos resultados respecto a una disminución de la viabilidad celular, también observaron que el tratamiento con LBH589 inducía parada en G1 del ciclo celular (301), mientras que Groselj *et al.* comprobaron que esta parada se producía en G2/M (306). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio, en los que el tratamiento con CQ y LBH589 aumenta la apoptosis con la dosis; sin embargo, existe una gran variabilidad en la sensibilidad a estos fármacos entre las distintas líneas celulares. Esto puede deberse al tipo celular (histología, estadio), a la distinta caracterización molecular de las líneas celulares, a la dosis empleada o al tiempo de tratamiento.

Una de las posibles causas de las diferencias entre las líneas celulares en cuanto al efecto obtenido, así como la disparidad con los datos publicados es la variabilidad en cuanto a dosis y tiempos empleados en el diseño de los experimentos. Las dosis de CQ empleadas

por otros son variables entre 10 y 80  $\mu\text{M}$ , con un tiempo de exposición también variable entre 24 horas y 72 horas. En el presente trabajo, las dosis administradas fueron las mismas para todas las líneas celulares con una medición de la supervivencia celular a las 72 horas de administrar el fármaco en monoterapia. Según la viabilidad celular, se ajustaron las dosis teniendo en cuenta el tamaño y el medio de las placas en las que se sembraron las células, de manera que la muerte celular obtenida se debiera al efecto de los tratamientos y no a una muerte celular por ‘falta de espacio y nutrientes’.

Al igual que para la RT, tras la administración de ambos fármacos se analizó la expresión de proteínas relacionadas con la autofagia. En la línea celular MDA-MB-231, la expresión de p62 se mantuvo similar al control tras administrar las tres dosis de LBH589. Al tratarse de un inductor de la autofagia, sería esperable ver una disminución de esta proteína. Esta situación podría deberse a que, en las células sin tratar, los niveles basales de esta proteína son bajos lo que dificultaría observar este descenso o a que podrían ser necesarias mayores concentraciones de este fármaco para observar un efecto sobre esta proteína. Tras el tratamiento con CQ, los niveles de expresión de p62 se mantienen en niveles similares en las tres dosis administradas, pero más altos que en el de control. Es decir, los resultados son compatibles con un bloqueo de la autofagia que impide la degradación del contenido seleccionado y, como consecuencia, hay una acumulación de p62. En el caso de la línea celular VCAP, el estudio de expresión de la proteína p62 mostró una disminución progresiva de esta proteína a medida que se aumentaba la dosis de LBH589. Esto coincide con lo publicado por otros grupos y el hecho de que LBH589 actúa como inductor de la autofagia (270,272,283).

Por otro lado, el estudio de la expresión de Beclin-1 en las líneas estudiadas no mostró notables variaciones entre el control y la administración de los tratamientos en monoterapia. En este trabajo se obtuvieron resultados variables. El tratamiento con irradiación no conllevó diferencias apreciables entre el control y el tratamiento. Por su parte, el tratamiento con LBH589, como inductor de la autofagia, provocó un discreto aumento de la expresión de esta proteína en la línea MDA-MB-231, mientras que se observó una disminución de su expresión en la línea VCAP respecto al control. Los datos publicados también son variables y esto se debe a que Beclin-1 puede participar en la autofagia como regular positivo o negativo (66,69).

En la línea celular MDA-MB-231, la expresión de las proteínas LC3 I y II se encuentra aumentada al recibir tratamiento con LBH589 en monoterapia respecto al control, misma situación que se daba también con la administración de radiación ionizante. En el caso de la línea VCAP solo la forma I, mientras que la II se mantiene muy similar al control. Al administrar tratamiento con CQ en la línea celular MDA-MB-231, se observa una mayor expresión de LC3 I respecto al control, aunque menor que la expresión de la forma II. La acumulación de la forma II indica que se están acumulando autofagosomas y no quiere decir, obligatoriamente, que se esté induciendo la autofagia, ya que puede ser que la autofagia se esté deteniendo en este punto y el proceso no concluya con la eliminación de dichos autofagosomas y su contenido. Sin embargo, la aparición de LC3 I quiere decir que la membrana de estos fagosomas se está desintegrando y que la proteína LC3 II que está en esa membrana está pasando al citoplasma como LC3 I. Teniendo en cuenta que la proteína p62 está aumentada, que se produce una acumulación de LC3 II y no aumenta LC3 I, la CQ parece estar inhibiendo el proceso de autofagia bloqueándose la degradación del autofagolisosoma lo que conduce a que no se recicle LC3 II y a que no se degrade p62.

Distintos grupos han estudiado el efecto de los tratamientos con CQ y HDACi en las proteínas del proceso autofágico. En el caso del tratamiento con CQ, observaron que tras el uso de este agente se producía un bloqueo del proceso de autofagia al alterarse la fusión de los autofagosomas con los lisosomas por la acidificación de dicho orgánulo. A nivel proteico, se observó un aumento en LC3 II, una disminución en LC3 I, un aumento de p62 y una disminución de Beclin-1 (222,288,289,291). Estos resultados son similares respecto a la expresión de LC3 II y p62 a los obtenidos en este trabajo en la línea celular MDA-MB-231. En el caso de los inhibidores de HDAC, distintos autores han descrito que estos agentes inducen el proceso autofágico caracterizándose a nivel proteico por una disminución de los niveles de p62 así como por un aumento en los niveles de LC3 I y II, y Beclin-1 (213,283,308,309). En este estudio, aunque se empleó otro HDACi, también se obtuvo un aumento de la expresión de LC3 tras la administración de este inductor de la autofagia, tanto en la línea celular MDA-MB-231 como VCAP. Respecto a p62, en la línea VCAP también se observó una disminución de su expresión, aunque no fue así para la línea MDA-MB-231, posiblemente porque en el control ya se partía de una expresión baja como se ha comentado previamente.

## 5.2. Tratamientos combinados en las líneas celulares de cáncer de mama, cabeza y cuello, y próstata

Tras analizar el tratamiento individual, procedimos a estudiar la combinación de RT con cada uno de los modificadores de la autofagia.

En la línea celular MDA-MB-231 se pudo observar una disminución de la supervivencia celular más pronunciada en ambas combinaciones de RT con LBH589 y CQ que el obtenido con cada agente en monoterapia. En relación con la hipótesis de este trabajo, en esta línea celular se comprobó que el efecto alcanzado por las dosis media y alta de radiación ionizante (5 y 7,5 Gy) es superado por la combinación de RT y CQ, de modo que podría reducirse la dosis de irradiación añadiendo el fármaco para conseguir el mismo efecto que a dosis altas de RT. Además, el tipo de muerte celular producido se distribuye entre apoptosis temprana, y apoptosis tardía junto a necrosis. Respecto a la combinación de RT más LBH589, la muerte celular secundaria predominante es la apoptosis tardía y necrosis. Esta combinación también confirma la hipótesis, ya que el tratamiento combinado supera el efecto alcanzado con RT a dosis altas en monoterapia. Por tanto, puede concluirse que en la línea celular MDA-MB-231 la adición de un modificador de la autofagia permitiría una disminución de la dosis de RT manteniendo el mismo efecto.

A continuación, se analizó si se trataba de un efecto sinérgico o aditivo mediante el método *Chou-Talalay* (233) y su índice de combinación (CI), comprobando que en esta línea celular la combinación de radiación ionizante con cualquiera de los dos agentes alcanzaba un efecto sinérgico, con un CI inferior a 1 que resultó ser leve y moderado (CI 0,7-0,85) para RT más LBH589, y moderado (CI 0,7-0,85) y normal (CI 0,3-0,7) para RT más CQ, es decir, que la combinación alcanza un efecto superior a la suma de los efectos de los tratamientos individuales. Por tanto, se trata de una línea de cáncer de mama que ha demostrado baja sensibilidad frente a la radiación ionizante y CQ, y mayor frente a dosis altas de LBH589 administrados de forma individual, pero sí se observó una potenciación del efecto cuando se realizaron dichas combinaciones.

En cuanto a la expresión de las proteínas relacionadas con la autofagia, el tratamiento combinado de RT y LBH589 en esta línea celular condujo a una disminución progresiva dosis dependiente de LBH589 de la proteína p62, a la vez que la expresión de LC3 I y II

aumentó respecto al control. De esta manera, puede deducirse que se está produciendo mayor autofagia en las combinaciones, sobre todo a dosis mayores, respecto al control y al tratamiento en monoterapia. En la combinación de RT y CQ, se obtuvo una expresión aumentada tanto de p62 como LC3 I y II respecto al control y mayor respecto a ambos tratamientos en monoterapia, lo que sería un indicativo de un bloqueo de la autofagia como se comentó previamente. La inhibición de la autofagia secundaria a la CQ superaría a la inducción de la misma producida por la radiación ionizante, produciéndose una inhibición global de la autofagia. Se puede ver un aumento de la autofagia tras la administración de un inductor y un inhibidor de la autofagia, ya que este proceso puede estar desencadenado, no solo por una causa, sino por varios agentes o situaciones estresantes.

La línea celular HCC-1937 también se sometió al tratamiento combinado observándose que la combinación de RT y CQ no aumenta la citotoxicidad celular comparando con los tratamientos en monoterapia. Esta suma de tratamientos se analizó mediante el método *Chou-Talalay* (233) obteniendo un CI superior a uno, es decir, efecto antagónico. Dado que efecto antagónico de una combinación de dos tratamientos se define como un efecto menor a la suma de los dos tratamientos simples, es coherente este CI mayor a uno con los datos obtenidos mediante citometría de flujo. No obstante, y siendo conscientes de que la muerte celular no alcanza el doble o un valor mayor, se ha considerado que la suma de los dos tratamientos no mejora el efecto de cada uno individual, pero no es un efecto antagónico que empeore el resultado de cada tratamiento individual si no que el efecto no se ve mejorado. Respecto a la combinación de RT con LBH589 en esta misma línea celular HCC-1937, se ha encontrado una situación similar. El CI es superior a uno en cualquiera de las combinaciones, es decir, se trata de un efecto antagónico. Teniendo en cuenta que el efecto de las combinaciones con las dos dosis menores es similar a la de ambos tratamientos en monoterapia, se ha planteado que la suma de estos tratamientos no aporta un beneficio. De manera secundaria y aunque no es el objetivo principal de este trabajo, la combinación de RT con LBH589 a dosis altas mejora el efecto conseguido por panobinostat® a dosis altas. Por ello, se ha considerado que, aunque LBH589 antagoniza el efecto de la RT, la radiación ionizante sí mejora el resultado obtenido por LBH589 por sí sola.

Analizando el tratamiento combinado en las dos líneas de cabeza y cuello estudiadas, se ha observado que la administración conjunta de RT y CQ en la línea CAL33 no mejoró el efecto citotóxico obtenido con la RT en monoterapia, lo que explicaría el efecto antagónico obtenido en el análisis de *Chou-Talalay* ( $CI > 1$ ) (233) en todas de las combinaciones estudiadas. Sin que sea el objetivo de este trabajo, sí se demostró que el tratamiento combinado mejora el efecto citotóxico de la CQ como tratamiento individual. Respecto a la combinación RT y LBH589 para esta esta línea, también se observa que la supervivencia es inferior cuando se administra LBH589 junto con RT, respecto a la administración de LBH589 en monoterapia por lo que la RT mejora el efecto de LBH589 individual. Sin embargo, el tratamiento combinado no mejora el efecto obtenido por la RT en monoterapia, lo que explicaría el efecto antagónico obtenido en el análisis de *Chou-Talalay* ( $CI > 1$ ) (233).

Por su parte, en la línea celular de cabeza y cuello 32860, se observó que la CQ por sí sola no tiene efecto a dosis bajas y la combinación con RT tampoco, siendo menor que la supervivencia celular con la administración de RT a dosis bajas en monoterapia. En esta combinación se produjo una muerte celular principalmente apoptótica temprana y el CI fue superior a uno indicando un efecto antagónico. La combinación a dosis medias y altas sí superó el efecto conseguido por el fármaco en monoterapia, pero dado que no alcanzaba la suma de los dos tratamientos administrados de forma individual, el CI es superior a 1 y lo considera antagónico. No obstante, a partir de los resultados obtenidos se cree que la RT sí mejoraba el efecto de la CQ y se mejoraba en menor medida el de la RT. En el caso de la combinación de RT y LBH589 en la línea 32860, el fármaco a dosis bajas no consiguió disminuir la supervivencia celular, sí a dosis más altas y la muerte celular fue sobre todo por apoptosis tardía y necrosis. La adición de LBH589 a RT mejoró los datos conseguidos por la RT en monoterapia, confirmando así nuestra hipótesis: es posible mantener el efecto bajando la dosis de RT y añadiendo un modificador de la autofagia. De hecho, en la combinación con dosis medias el LBH589 aumentó el efecto de la RT, obteniéndose un efecto sinérgico ( $CI < 1$ ). En la combinación con dosis altas, el efecto obtenido fue aditivo si bien existe un mayor efecto citotóxico que con el tratamiento en monoterapia. Por el contrario, a dosis bajas no se observó una mejora de la citotoxicidad con el tratamiento combinado ( $CI > 1$ ). En este caso también se pudo observar de forma secundaria que la combinación de tratamientos mejoraba de forma importante el efecto alcanzado por el panobinostat® individual.

Por último, en la línea celular de cáncer de próstata VCAP, la combinación entre RT y CQ confirmó la hipótesis de este trabajo, de una manera clara al demostrar que la combinación a dosis bajas de radioterapia nos permitía mantener, incluso mejorar, el efecto alcanzado por la RT en monoterapia a dosis altas, produciendo una muerte celular repartida entre muerte apoptótica y no apoptótica según las dosis combinadas. Además, mediante el método *Chou-Talalay* (233) se comprobó efecto sinérgico cuando se combinaron dosis bajas de los agentes ( $CI=0.79$ , efecto sinérgico moderado), si bien no fue así para dosis medias y altas ( $CI>1$ , efecto antagónico). Aunque el CI fue superior a 1 en el caso de las dosis medias y altas, al observar el porcentaje de muerte celular por citometría de flujo se observó un efecto similar en la combinación respecto a los individuales, es decir, al no alcanzar la suma de los dos tratamientos el algoritmo del programa lo considera antagónico pero el efecto se mantiene. Respecto al tratamiento de RT más LBH589, la combinación en cualquiera de las dosis mejoró cualquiera de los dos tratamientos en monoterapia y permitió confirmar nuevamente la hipótesis de nuestro trabajo ya que la combinación de dosis bajas de radiación ionizante al menos mantuvo el efecto alcanzado por la RT en monoterapia a dosis altas. Por otro lado, el estudio de este efecto demostró que se trataba de un efecto sinérgico ( $CI<1$ , efecto sinérgico normal o leve).

El estudio de la expresión de las proteínas relacionadas con la autofagia en el tratamiento combinado de RT junto a LBH589 de la línea celular VCAP mostró que la expresión de la proteína p62 disminuía respecto al control, siendo similar al resultado de RT en monoterapia y menor al de LBH589 individual. Por tanto, parece lógico pensar que la combinación de estos dos tratamientos aumenta los niveles de autofagia. Por último, la expresión de las proteínas LC3 I y II tras recibir tratamiento combinado de RT y LBH589 en VCAP mostró un aumento más marcado respecto al control y a los tratamientos individuales, especialmente en la forma I, que sería un indicador de que se está produciendo un reciclaje de LC3 II. Todo esto parece indicar que la combinación sí que consigue inducir autofagia en mayor medida que en monoterapia.

Como ya se ha comentado previamente, dado que existen diferencias conocidas entre las líneas celulares y existirán más que no conocemos, se puede pensar que estas características podrían influir en la respuesta a los tratamientos y explicar en parte los resultados obtenidos. Un ejemplo de ello es el estado de *BRCA1*, *KRAS* o *TP53* que

pueden determinar una mayor sensibilidad o resistencia a la RT, así como modificaciones en la vía de la autofagia (254,255).

El empleo de tratamientos combinados puede, en ciertas circunstancias, doblar la resistencia de las células tumorales a monoterapias. En múltiples trabajos se ha estudiado el uso de moduladores de autofagia para mejorar la respuesta a tratamientos estándar. Otros trabajos de nuestro grupo han evaluado el papel de este tipo de fármacos a nivel del ADN, demostrando que la CQ produce un daño directo en el ADN, mientras que el LBH589 inhibe los mecanismos de reparación tras la inducción de un daño. De esta manera, la combinación de varios agentes que actúen en diferentes puntos del daño y reparación del ADN puede suponer una ventaja terapéutica (310).

En concreto, *Solomon et al.* analizaron el efecto de la CQ en combinación con multitud de agentes antitumorales, uno de ellos la RT, en varias líneas de cáncer de mama y observaron que la combinación de estos dos tratamientos potencia la citotoxicidad por la suma de la apoptosis inducida por RT y la necrosis inducida por CQ (42), datos que coinciden con los que se han obtenido en el presente trabajo. Otros grupos combinaron CQ con varios tratamientos de quimioterapia en líneas celulares de hepatocarcinoma o cáncer de vejiga, observando un aumento de la citotoxicidad en los grupos que recibían tratamiento combinado de ese agente más CQ frente al tratamiento individual de dicho fármaco (311–313). Es decir, la CQ ha demostrado un efecto sensibilizador ante tratamientos citotóxicos en algunas líneas celulares. Asimismo, los grupos de *Zhao et al.* y *Cai et al.* analizaron el papel de la CQ como radiosensibilizante en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (244,256). La combinación de CQ con RT producía un aumento de la muerte celular frente a las células que no habían recibido CQ (244,256), misma conclusión del presente trabajo. La tasa de apoptosis fue similar en las células radiadas tratadas o no previamente con CQ, sin embargo, la tasa de necrosis era mucho mayor en el grupo tratado previamente con CQ (256), por lo que concluyeron que la muerte asociada a la RT mediante apoptosis y la asociada a CQ mediante necrosis, aumentaba la citotoxicidad del tratamiento combinado frente a los tratamientos individuales en la línea celular MDA-MB-231(256). En el presente trabajo también se observó que las células tratadas con CQ previamente a RT presentaban mayores tasas de muerte apoptótica y necrótica, frente a las células tratadas con radiación ionizante exclusivamente. Otros estudios han comprobado este papel radiosensibilizante de la CQ

en líneas celulares de otros tipos de tumores como el glioblastoma (296). En este trabajo se comprobó que el mayor efecto citotóxico en la combinación de RT con CQ administrada previamente respecto a ambos tratamientos individuales llegó a ser sinérgico en determinadas condiciones. Asimismo, se obtuvo que las células tratadas con la combinación presentaban un bloqueo de la autofagia. El proceso de la autofagia puede actuar como mecanismo de supervivencia ante determinados agentes externos, entre ellos la radiación ionizante, de modo que, si la combinación con otro agente permite la inhibición del proceso autofágico, se podría aumentar la muerte celular observada tras el tratamiento combinado. De hecho, en distintos estudios se ha observado que el tratamiento con CQ puede sensibilizar a distintos tratamientos antitumorales que inducen el proceso autofágico como mecanismo de resistencia frente a los mismos. Cook *et al.* describieron en líneas celulares de cáncer de mama resistentes a tratamientos antiestrogénicos que la administración de CQ inhibe la autofagia, lo que se traduce en un aumento de p62 y LC3 I y II, datos también obtenidos en este trabajo, así como por el aumento de la respuesta antiestrogénica de ambas líneas en el tratamiento combinado con tamoxifeno y faslodex (95). El grupo de Sasaki *et al.*, obtuvo un resultado similar cuando estudiaron el efecto de la CQ combinado con el agente quimioterápico 5-Fluorouracilo (5-FU), tratamiento de primera línea en cáncer de colon (226). En este caso, estos autores también obtuvieron una reducción de la proliferación celular superior a la obtenida con 5-FU y una mayor apoptosis cuando las células se pretrataban con CQ (226). Por otro lado, al administrar el quimioterápico 5-FU se induce la autofagia (mayor nivel de LC3 I-II) como mecanismo protector y cuando las células son pretratadas con CQ se produce un mayor aumento en la proteína LC3 I-II (226). Resultados similares se han observado en líneas celulares de pulmón, en las que el uso de CQ mejoraba el efecto citotóxico obtenido tras el tratamiento con erlotinib y topotecán (efecto sinérgico) y donde el uso de CQ aumentaba los niveles de LC3 I y II, así como de p62 (228,229).

Por otro lado, también se han publicado estudios en los que se emplea la combinación de HDACi con distintos agentes terapéuticos, entre ellos la RT como estrategia para mejorar el efecto terapéutico. Diferentes autores han trabajado con líneas celulares de cáncer de próstata, de mama, de pulmón, de cabeza y cuello, de páncreas, colorrectal, cerebral y melanoma. Se ha observado que la combinación de estos dos tratamientos disminuye la supervivencia celular, aumentando la radiosensibilidad de aquellas células tratadas previamente con HDACi, a través de múltiples vías (236,314–322). Los grupos de

Munshi, Baschnagel y Deorukhkar coincidieron en sus observaciones respecto a que el vorinostat inhibía la capacidad de reparación del daño en el ADN y potenciaba el efecto de la radiación ionizante a través de la apoptosis y catástrofe mitótica (315,316,318). Otros trabajos de nuestro laboratorio también han observado que el LBH589 inhibe los mecanismos de reparación de daños al ADN (310).

Chiu *et al.* estudiaron el efecto de la RT y su combinación con un HDACi, el TMU-35435, como radiosensibilizante en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (236). Por un lado, observaron que, en las dos líneas empleadas se producía una disminución de la viabilidad celular dosis dependiente al administrar el tratamiento en monoterapia y, por otro, que la combinación de ambos tratamientos mejoraba significativamente el efecto comparado con los tratamientos simples (efecto sinérgico) (236). Por otro lado, analizaron el impacto sobre la autofagia mediante el estudio de la expresión de LC3 II en correlación con el número de autofagosomas, demostrando mayor expresión de esta proteína en el tratamiento combinado frente a los tratamientos en monoterapia (236). También hay estudios referentes al panobinostat® en distintas líneas celulares. Grosej *et al.* observaron que actúa como un potente radiosensibilizante en líneas celulares de cáncer de vejiga (306). Por otro lado, dado el papel de la RT en el tratamiento del cáncer de próstata, el grupo de Xiao *et al.* estudió *in vitro* la posibilidad de mejorar los resultados combinando la radiación ionizante con LBH589 comprobando que el tratamiento combinado inducía mayor porcentaje de apoptosis frente a la RT en monoterapia, así como un aumento del número de células en G1 del ciclo celular, a la vez inhibía la parada en G2/M inducido por la radiación ionizante (267). Este grupo y el Viani de Andrade observaron que mediante la combinación de tratamientos aumentaba el RCD y disminuían las vías de NHEJ y RH (267,323). En el presente análisis de la línea MDA-MB-231 también se observó que la combinación de un HDACi, en este caso panobinostat®, con radiación ionizante mejoraba el efecto alcanzado en monoterapia y, además, se trataba de un efecto sinérgico. Respecto a la expresión de proteínas, se coincidió en un aumento de la expresión de las proteínas relacionadas con la autofagia LC3B I y II, así como una disminución de p62 y Beclin-1, como corresponde a una situación en la que la autofagia está aumentada.

Al igual que la CQ, los HDACi, incluido el panobinostat® se ha combinado no solo con RT, sino también con agentes quimioterápicos y terapias dirigidas para potenciar su efecto

en diversas líneas celulares. Palumbo *et al.* estudió la modulación de la autofagia en la línea celular de glioblastoma tras la administración de rapamicina, inhibidor de mTOR, se objetivó una inducción de la autofagia, esto mejoró la radiosensibilidad en ambas líneas celulares y disminuyó la viabilidad celular (324). Wu *et al.* también trabajaron rapamicina en dos líneas de carcinoma escamoso de cáncer oral observando que la administración de este fármaco junto a RT producía una elevación de los niveles de autofagia e inducía la muerte en la línea celular OC3 (143). Regel *et al.* compararon los resultados de tratar líneas celulares de cáncer gástrico con la quimioterapia en monoterapia o quimioterapia más LBH589, observando que el panobinostat® inhibe la proliferación celular y sensibiliza frente a la quimioterapia (298). Por su parte, Greve *et al.* estudió la combinación de LBH589 junto a erlotinib en varias líneas celulares de cáncer de pulmón, demostrando una disminución de la supervivencia celular frente a la monoterapia (325). El grupo de la Rosa *et al.* trabajó con células *in vitro* de glioblastoma y comprobó, no solo, que el tratamiento con LBH589 induce la apoptosis, sino que tanto en monoterapia como en combinación con 3-deazaneplanocin-A inhibe la capacidad metastásica, la angiogénesis e inducía la entrada en la fase S del ciclo celular (305). Lemoine *et al.* combinaron el panobinostat® con un inhibidor de mTOR con el objetivo de aumentar el efecto citotóxico en líneas celulares de linfoma de Hodgkin (302). Comprobaron que ambos fármacos tienen efectos opuestos en la vía mTOR, pero su combinación disminuye la supervivencia celular y además que este efecto es sinérgico mediante el método *Chou-Talalay* (302). Por su parte, Mosleh *et al.* combinó LBH589 con un inhibidor de PI3K observando que aumentaba la citotoxicidad frente al HDACi en monoterapia (301). Por tanto, aunque la autofagia pueda ser usada como mecanismo de resistencia, si aumentamos sus niveles mediante LBH589 como utilizamos en nuestros experimentos u otros agentes, como la rapamicina que han usado estos grupos, podemos llegar a mejorar el efecto antitumoral de la RT.

El papel dual de la autofagia y la falta del conocimiento completo sobre todas sus vías y cómo participa en la tumorigénesis, hace que actualmente nos encontremos ante resultados paradójicos. A pesar de ellos, en los últimos años se han diseñado estudios clínicos para comprobar el beneficio de la modulación de la autofagia (254,255,326) (199,327–333). Se han realizado diversos estudios en los que se empleaba tratamiento combinado de CQ e irradiación en pacientes con diagnóstico de tumores cerebrales primarios y metastásicos, obteniendo una mejora en la mediana de la supervivencia y una

mejora del control local (334–338). Estos estudios no demostraron aumento de la toxicidad (255). Por otro lado, algunos estudios han analizado el efecto de la combinación de CQ con otros agentes farmacológicos, como el vemurafenib (inhibidor de BRAF) también en tumores cerebrales, demostrando la posibilidad de actuar sobre la vía de la autofagia en la práctica clínica (339,340). De ahí, el papel de las mutaciones presentes en los tumores y la importancia de elegir el grupo de pacientes que más se beneficiarían de este tipo de tratamientos. Respecto a los HDACi, también los últimos años se han desarrollado estudios para evaluar su papel como terapia antitumoral tanto en tumores sólidos como hematológicos (199,327–333,341,342). Concretamente, el panobinostat® ha sido empleado en estudios fase I de tumores cerebrales primarios combinados con radiación ionizante demostrando seguridad (327). Hay otros estudios de panobinostat® con otros agentes para el tratamiento de tumores cerebrales como el bevacizumab que, aunque han demostrado ser bien tolerados, no hay demostrado beneficio clínico en cuanto la supervivencia libre de progresión (329). La tabla 19 recoge algunos de los ensayos clínicos que combinan modificadores de la autofagia con radiación ionizante.

Tabla 19. Estudios clínicos que combinan modificadores de la autofagia con RT.

Tumor	Agente 1	Agente 2	Fase del ensayo clínico	Respuesta clínica	Efectos secundarios
Glioblastoma (336)	CQ	Temozolamida + RT	III	Mediana de supervivencia 24 meses vs 11 meses	Mielosupresión grado I
Recaída de glioblastoma (343)	CQ	RT	Serie de casos (5 pacientes)	2 respuesta parcial 1 enfermedad estable	No
Metástasis cerebrales (338)	CQ	RT	II	Tasa de respuesta: 54% vs. 55% Supervivencia libre de progresión al año: 83.9% vs. 55.1%	Cefalea, mareo, náuseas y vómitos, anorexia y mielosupresión grado 1-2 Náuseas, estreñimiento, astenia, cefalea grado 3

Glioblastoma recurrente	LBH589	RT	I (12 pacientes)	Seguridad y toxicidad	Grado 3 radionecrosis en 1 paciente Grado 4 neutropenia en 1 paciente
-------------------------	--------	----	------------------	-----------------------	--------------------------------------------------------------------------

Estos resultados plantean la posibilidad de utilizar moduladores de la autofagia en la práctica clínica, aunque es necesario la realización de más estudios y con un número mayor de pacientes.

A nivel de ensayos preclínicos, algunas de las diferencias respecto a los tratamientos combinados observadas entre este trabajo y los publicados anteriormente, además de la variabilidad en la bibliografía podrían deberse al diseño experimental, dosis empleadas y tiempos de medición como ya se comentó en los tratamientos en monoterapia. Los tiempos empleados varían entre las 12 y 24 horas de premedicación, así como los tiempos tras la administración del tratamiento completo para la medición de la viabilidad celular entre 24 y 72 horas. Las dosis también son variables según los agentes combinados y las líneas celulares empleadas. Por otro lado, respecto al método para valorar la supervivencia y muerte celulares, existen varias opciones entre las que destacan MTT, *Apoptosis Detection Kit CE (Immunostep)* o ensayos clonogénicos.

Los resultados del presente trabajo muestran variabilidad entre las líneas celulares incluidas, lo que sugiere que esta asociación no es siempre útil y se debe definir el perfil molecular del tumor antes del tratamiento combinado. En este sentido, una limitación de este trabajo es el desconocimiento del genotipo completo de las líneas celulares empleadas cuyas características pueden influir tanto en las vías de la autofagia y otros tipos de muerte celular, como en la respuesta a los diferentes agentes empleados.

## ***6. CONCLUSIONES***

1. Dependiendo del fenotipo y genotipo de la célula tumoral la respuesta a los tratamientos de radioterapia, cloroquina y panobinostat®, así como sus combinaciones, es variable.
2. El efecto de los fármacos moduladores de la autofagia es proteiforme, no centrándose solo en la regulación de la autofagia.
3. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la combinación de radioterapia y moduladores de la autofagia consigue un efecto sinérgico, aunque depende de la línea celular.
4. La administración concomitante de radiación ionizante y moduladores de la autofagia permite reducir dosis de radioterapia para alcanzar el mismo efecto, lo que permitiría trasladarlo a la práctica clínica.



## ***7. BIBLIOGRAFÍA***

1. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*. 1999 Jul 29;400(6743):464–8.
2. Conde-Pérezprina JC, Leon Galván MA, KONIGSBERG m. DNA Mismatch Repair System: Repercussions in Cellular Homeostasis and Relationship with Aging. *Oxid Med Cell Longev* [Internet]. 2012 Nov [cited 2020 Jun 14];5. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/233850107\\_DNA\\_Mismatch\\_Repair\\_System\\_Repercussions\\_in\\_Cellular\\_Homeostasis\\_and\\_Relationship\\_with\\_Aging](https://www.researchgate.net/publication/233850107_DNA_Mismatch_Repair_System_Repercussions_in_Cellular_Homeostasis_and_Relationship_with_Aging)
3. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Vol. 100, *Cell*. Cell; 2000. p. 57–70.
4. Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. Vol. 7, *American Journal of Cancer Research*. E-Century Publishing Corporation; 2017. p. 1016–36.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. Vol. 144, *Cell*. 2011. p. 646–74.
6. SEOM. LAS CIFRAS DEL CÁNCER EN ESPAÑA 2020. SEOM. 2020.
7. Global Cancer Observatory [Internet]. [cited 2020 Jun 14]. Available from: <https://gco.iarc.fr/>
8. REDECAN - Red Española de Registros de Cáncer [Internet]. [cited 2020 May 30]. Available from: <https://www.redecan.es/redecan.org/es/index.html>
9. Ezzati M, Lopez AD, Rodgers A, Vander Hoorn S, Murray CJL. Selected major risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet*. 2002 Nov 2;360(9343):1347–60.
10. Ford ES, Bergmann MM, Kröger J, Schienkiewitz A, Weikert C, Boeing H. Healthy living is the best revenge: Findings from the European prospective investigation into cancer and nutrition-potsdam study. *Arch Intern Med*. 2009 Aug 10;169(15):1355–62.
11. Aicr, WCRF. Diet, Nutrition, Physical Activity and Cancer: a Global Perspective A summary of the Third Expert Report [Internet]. [cited 2020 Jun 14]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
12. Romaguera D, Vergnaud AC, Peeters PH, Van Gils CH, Chan DSM, Ferrari P, et al. Is concordance with World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research guidelines for cancer prevention related to subsequent risk of cancer? Results from the EPIC study. *Am J Clin Nutr*. 2012 Jul;96(1):150–63.

13. REDECAN - Red Española de Registros de Cáncer [Internet]. [cited 2020 May 9]. Available from: <https://www.redecn.es/redecn.org/es/index.html>
14. Sia J, Szmyd R, Hau E, Gee HE. Molecular Mechanisms of Radiation-Induced Cancer Cell Death: A Primer. Vol. 8, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
15. Poon RYC. Cell cycle control: A system of interlinking oscillators. *Methods Mol Biol*. 2016;1342:3–19.
16. Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: Mitotic catastrophe [Internet]. Vol. 15, *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ; 2008 [cited 2020 Aug 4]. p. 1153–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18404154/>
17. Kar S. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer. Vol. 2, *Cell Systems*. Cell Press; 2016. p. 8–10.
18. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer [Internet]. Vol. 432, *Nature*. Nature; 2004 [cited 2020 Aug 4]. p. 316–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15549093/>
19. Zheng K, He Z, Kitazato K, Wang Y. Selective autophagy regulates cell cycle in cancer therapy. *Theranostics*. 2019;9(1):104–25.
20. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. Vol. 25, *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2018. p. 486–541.
21. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Kepp O, Kroemer G. Regulated cell death and adaptive stress responses. Vol. 73, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2016. p. 2405–10.
22. Galluzzi L, Yamazaki T, Kroemer G. Linking cellular stress responses to systemic homeostasis. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 731–45.
23. Krysko D V., Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. Vol. 12, *Nature Reviews Cancer*. Nat Rev Cancer; 2012. p. 860–75.
24. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death [Internet]. Vol. 29, *Cell Research*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2020 Jul 18]. p. 347–64. Available from:

<https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>

25. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications [Internet]. Vol. 14, *Cell Death and Differentiation*. Cell Death Differ; 2007 [cited 2020 Aug 4]. p. 1237–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17431418/>
26. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Vol. 258, *Journal of Internal Medicine*. J Intern Med; 2005. p. 479–517.
27. D’Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* [Internet]. 2019 Jun 25 [cited 2020 May 31];43(6):582–92. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cbin.11137>
28. Gudipaty SA, Conner CM, Rosenblatt J, Montell DJ. Unconventional Ways to Live and Die: Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease.
29. Joiner M, Kogel A van der. Basic clinical radiobiology.
30. Henry-Mowatt J, Dive C, Martinou JC, James D. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. Vol. 23, *Oncogene*. Oncogene; 2004. p. 2850–60.
31. Shamas-Din A, Kale J, Leber B, Andrews DW. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Apr;5(4):1–21.
32. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. Vol. 15, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nat Rev Mol Cell Biol; 2014. p. 49–63.
33. Moldoveanu T, Follis AV, Kriwacki RW, Green DR. Many players in BCL-2 family affairs. Vol. 39, *Trends in Biochemical Sciences*. Trends Biochem Sci; 2014. p. 101–11.
34. Eriksson D, Stigbrand T. Radiation-induced cell death mechanisms. Vol. 31, *Tumor Biology*. 2010. p. 363–72.
35. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death [Internet]. Vol. 15, *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Sep 27]. p. 1–9. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>
36. Sabin RJ, Anderson RM. Cellular Senescence - its role in cancer and the response to ionizing radiation. Vol. 2, *Genome Integrity*. 2011.
37. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Influence of autophagy on the efficacy of

- radiotherapy. Vol. 12, Radiation Oncology. BioMed Central Ltd.; 2017.
38. Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2020 Jun 27];23(7):798–803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19279323/>
  39. Bustos SO, Antunes F, Rangel MC, Chammas R. Emerging Autophagy Functions Shape the Tumor Microenvironment and Play a Role in Cancer Progression - Implications for Cancer Therapy [Internet]. Vol. 10, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2020 [cited 2021 Jan 17]. p. 2549. Available from: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)
  40. De Colon T, María A, Temprano M, Rogelio ;, Sarmiento G. Efecto del Taxol sobre la autofagia en células tumorales de colon = Taxol Effect in Autophagy of Colon Cancer Cells. 2017;2:41–51.
  41. Orallo C, Rogelio L;, Sarmiento G. Evaluación del efecto de la cloroquina sobre la autofagia en células tumorales de mama y su posible utilidad como fármaco antineoplásico = Evaluation of Chloroquine Effect in Autophagy of Breast Cancer Cells and its Possible Use in Chemotherapy. Vol. 1. 2016.
  42. Solomon VR, Lee H. Chloroquine and its analogs: A new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. Vol. 625, *European Journal of Pharmacology*. 2009. p. 220–33.
  43. Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: A novel BH3-only protein. Vol. 27, *Oncogene*. Oncogene; 2008. p. S137–48.
  44. Mizushima N. Autophagy in protein and organelle turnover. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:397–402.
  45. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: Core machinery and adaptations [Internet]. Vol. 9, *Nature Cell Biology*. *Nat Cell Biol*; 2007 [cited 2020 Aug 5]. p. 1102–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17909521/>
  46. Singh R, Cuervo AM. Autophagy in the Cellular Energetic Balance. 2011;
  47. Ryter SW, Cloonan SM, Choi AMK. Autophagy: A critical regulator of cellular metabolism and homeostasis [Internet]. Vol. 36, *Molecules and Cells*. *Mol Cells*; 2013 [cited 2020 Aug 5]. p. 7–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23708729/>
  48. Ravanan P, Srikumar IF, Talwar P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses [Internet]. Vol. 188, *Life Sciences*. Elsevier Inc.; 2017 [cited 2021 Jan

- 9]. p. 53–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28866100/>
49. Yun HR, Jo YH, Kim J, Shin Y, Kim SS, Choi TG. Roles of autophagy in oxidative stress. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Jan 23];21(9). Available from: </pmc/articles/PMC7246723/?report=abstract>
  50. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2011 Nov 10;27(1):107–32.
  51. Hara T, Takamura A, Kishi C, Iemura SI, Natsume T, Guan JL, et al. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2008 May 5;181(3):497–510.
  52. Pyo JO, Nah J, Jung YK. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* [Internet]. 2012 [cited 2020 Jun 27];44(2):73–80. Available from: </pmc/articles/PMC3296815/?report=abstract>
  53. Kenney DL, Benarroch EE. The autophagy-lysosomal pathway. *Neurology* [Internet]. 2015 Aug 18 [cited 2020 Aug 6];85(7):634–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26203091/>
  54. Todde V, Veenhuis M, van der Klei IJ. Autophagy: Principles and significance in health and disease [Internet]. Vol. 1792, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. *Biochim Biophys Acta*; 2009 [cited 2020 Aug 6]. p. 3–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19022377/>
  55. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. 2010;
  56. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: A double-edged sword of autophagy. Vol. 73, *Cancer Research*. American Association for Cancer Research; 2013. p. 3–7.
  57. Hu L, Wang H, Huang L, Zhao Y, Wang J. Crosstalk between autophagy and intracellular radiation response (Review) [Internet]. Vol. 49, *International Journal of Oncology*. Spandidos Publications; 2016 [cited 2021 Jan 9]. p. 2217–26. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3719/abstract>
  58. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, et al. The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF-κB Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell* [Internet]. 2008 Apr 8 [cited 2020 Jul 19];13(4):343–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18394557/>
  59. Moscat J, Diaz-Meco MT. P62: A versatile multitasker takes on cancer [Internet].

- Vol. 37, Trends in Biochemical Sciences. NIH Public Access; 2012 [cited 2020 Jul 19]. p. 230–6. Available from: /pmc/articles/PMC3531712/?report=abstract
60. Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. Vol. 22, Current Opinion in Cell Biology. *Curr Opin Cell Biol*; 2010. p. 132–9.
  61. Nobukuni T, Joaquin M, Rocco M, Dann SG, Kim SY, Gulati P, et al. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 4;102(40):14238–43.
  62. Yoshida GJ. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: From pathophysiology to treatment [Internet]. Vol. 10, Journal of Hematology and Oncology. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2020 Aug 11]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28279189/>
  63. Furuya T, Kim M, Lipinski M, Li J, Kim D, Lu T, et al. Negative Regulation of Vps34 by Cdk Mediated Phosphorylation. *Mol Cell*. 2010 May 28;38(4):500–11.
  64. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*. 2008 Dec;19(12):5360–72.
  65. Yan Y, Flinn RJ, Wu H, Schnur RS, Backer JM. hVps15, but not Ca<sup>2+</sup>/CaM, is required for the activity and regulation of hVps34 in mammalian cells. *Biochem J*. 2009 Feb 1;417(3):747–55.
  66. Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, et al. Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol*. 2009;11(4):385–96.
  67. Fan W, Nassiri A, Zhong Q. Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):7769–74.
  68. Sun Q, Fan W, Chen K, Ding X, Chen S, Zhong Q. Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 9;105(49):19211–6.
  69. 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;11(4):468–76.
  70. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M, Sato Y, et al. Bif-1

- interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol.* 2007 Oct 23;9(10):1142–51.
71. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D, Oh BH, et al. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.* 2006 Jul;8(7):688–98.
  72. Kim HJ, Zhong Q, Sheng Z-H, Yoshimori T, Liang C, Jung JU. Beclin-1-interacting autophagy protein Atg14L targets the SNARE-associated protein Snapin to coordinate endocytic trafficking. *J Cell Sci* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2020 Jun 3];125(Pt 20):4740–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22797916>
  73. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T, Kominami E. The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem.* 2001 Jan 19;276(3):1701–6.
  74. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 2003 May 1;116(9):1679–88.
  75. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* [Internet]. 2000 Nov 23 [cited 2020 Jun 6];408(6811):488–92. Available from: <http://www.nature.com/articles/35044114>
  76. Burman C, Ktistakis NT. Autophagosome formation in mammalian cells. Vol. 32, *Seminars in Immunopathology*. Springer Verlag; 2010. p. 397–413.
  77. Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2013 [cited 2020 Aug 11]. p. 759–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24201109/>
  78. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol.* 2000 Oct 16;151(2):263–75.
  79. 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.

80. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, Roberts EA, et al. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.* 2008 Jul;10(7):776–87.
81. Renna M, Schaffner C, Winslow AR, Menzies FM, Peden AA, Floto RA, et al. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *J Cell Sci.* 2011 Feb 1;124(3):469–82.
82. Tresse E, Salomons FA, Vesa J, Bott LC, Kimonis V, Yao TP, et al. VCP/p97 is essential for maturation of ubiquitin-containing autophagosomes and this function is impaired by mutations that cause IBMPFD. *Autophagy.* 2010 Feb 16;6(2):217–27.
83. Rusten TE, Vaccari T, Lindmo K, Rodahl LMW, Nezis IP, Sem-Jacobsen C, et al. ESCRTs and Fab1 Regulate Distinct Steps of Autophagy. *Curr Biol.* 2007 Oct 23;17(20):1817–25.
84. Santana-Codina N, Mancias JD, Kimmelman AC. The Role of Autophagy in Cancer. *Annu Rev Cancer Biol* [Internet]. 2017 Mar 6 [cited 2020 Jun 27];1(1):19–39. Available from: [/pmc/articles/PMC6527373/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36527373/)
85. Mari M, Griffith J, Rieter E, Krishnappa L, Klionsky DJ, Reggiori F. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *J Cell Biol.* 2010 Sep 20;190(6):1005–22.
86. Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, et al. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* [Internet]. 2006 Sep 15 [cited 2020 Aug 6];119(18):3888–900. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16940348/>
87. Tooze SA, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. Vol. 12, *Nature Cell Biology.* Nature Publishing Group; 2010. p. 831–5.
88. van der Vaart A, Reggiori F. The Golgi complex as a source for yeast autophagosomal membranes. *Autophagy* [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2020 Jun 7];6(6):800–1. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20714226>
89. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol.* 2009 Dec;11(12):1433–7.
90. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in Health and Disease: A Double-Edged Sword.

91. Kimmelman AC. The dynamic nature of autophagy in cancer [Internet]. Vol. 25, *Genes and Development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2011 [cited 2020 Jun 27]. p. 1999–2010. Available from: [/pmc/articles/PMC3197199/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094039/)
92. Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2008 Mar [cited 2020 Jun 27];19(3):797–806. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094039/>
93. Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis [Internet]. Vol. 584, *FEBS Letters*. NIH Public Access; 2010 [cited 2020 Jun 27]. p. 1427–35. Available from: [/pmc/articles/PMC2843775/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094039/)
94. Levine B, Abrams J. p53: The Janus of autophagy? *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 Jun [cited 2020 Aug 11];10(6):637–9. Available from: [/pmc/articles/PMC2739720/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18094039/)
95. Cook KL, Wärrri A, Soto-Pantoja DR, Clarke PAG, Cruz MI, Zwart A, et al. Chloroquine inhibits autophagy to potentiate antiestrogen responsiveness in ER+ breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2014 Jun 15;20(12):3222–32.
96. Delaney GP, Barton MB. Evidence-based Estimates of the Demand for Radiotherapy. *Clin Oncol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2020 Jun 20];27(2):70–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25455408/>
97. Fundamentos de Física Médica Fundamentos de Física Médica Fundamentos de Física Médica [Internet]. [cited 2020 Jun 27]. Available from: [www.auladoc.com](http://www.auladoc.com)
98. Ringborg U, Bergqvist D, Brorsson B, Cavallin-Ståhl E, Ceberg J, Einhorn N, et al. The Swedish Council on Technology Assessment in Health Care (SBU) systematic overview of radiotherapy for cancer including a prospective survey of radiotherapy practice in Sweden 2001 - Summary and conclusions. Vol. 42, *Acta Oncologica*. *Acta Oncol*; 2003. p. 357–65.
99. Maier P, Hartmann L, Wenz F, Herskind C. Cellular pathways in response to ionizing radiation and their targetability for tumor radiosensitization. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
100. Schae D, McBride WH. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2020 Aug 11]. p. 527–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26122185/>

101. Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Ten Haken RK, Constine LS, Eisbruch A, et al. Use of Normal Tissue Complication Probability Models in the Clinic. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010 Mar 1;76(3 SUPPL.).
102. Thariat J, Hannoun-Levi JM, Sun Myint A, Vuong T, Gérard JP. Past, present, and future of radiotherapy for the benefit of patients [Internet]. Vol. 10, *Nature Reviews Clinical Oncology*. *Nat Rev Clin Oncol*; 2013 [cited 2020 Aug 11]. p. 52–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23183635/>
103. Marcu LG. Altered fractionation in radiotherapy: From radiobiological rationale to therapeutic gain [Internet]. Vol. 36, *Cancer Treatment Reviews*. *Cancer Treat Rev*; 2010 [cited 2020 Aug 11]. p. 606–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20494524/>
104. Deckbar D, Jeggo PA, Löbrich M. Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints [Internet]. Vol. 46, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 2011 [cited 2020 Jun 20]. p. 271–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21524151/>
105. Harper JW, Elledge SJ. The DNA Damage Response: Ten Years After [Internet]. Vol. 28, *Molecular Cell*. *Cell Press*; 2007 [cited 2020 Jun 20]. p. 739–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18082599/>
106. Pajonk F, Vlashi E, McBride WH. Radiation resistance of cancer stem cells: The 4 R's of radiobiology revisited [Internet]. Vol. 28, *Stem Cells*. *Stem Cells*; 2010 [cited 2020 Aug 11]. p. 639–48. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20135685/>
107. Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: Regulating the cellular response to genotoxic stress, and more [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2013 [cited 2020 Jun 20]. p. 197–210. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23486281/>
108. Kelley MR, Fishel ML. Overview of DNA repair pathways, current targets, and clinical trials bench to clinic. In: *DNA Repair in Cancer Therapy: Molecular Targets and Clinical Applications: Second Edition* [Internet]. Elsevier Inc.; 2016 [cited 2020 Oct 25]. p. 1–54. Available from: <https://indiana.pure.elsevier.com/en/publications/overview-of-dna-repair-pathways-current-targets-and-clinical-tria>
109. Cooper GM. *DNA Repair*. 2000 [cited 2020 Oct 25]; Available from:

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9900/>
110. Stucki M, Jackson SP.  $\gamma$ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes [Internet]. Vol. 5, DNA Repair. DNA Repair (Amst); 2006 [cited 2020 Jun 20]. p. 534–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16531125/>
  111. Marples B, Wouters BG, Collis SJ, Chalmers AJ, Joiner MC. Low-Dose Hyper-radiosensitivity: A Consequence of Ineffective Cell Cycle Arrest of Radiation-Damaged G<sub>2</sub>-Phase Cells. *Radiat Res* [Internet]. 2004 Mar [cited 2020 Jun 20];161(3):247–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14982490/>
  112. Washington CM, Leaver DT. Principles and Practice of Radiation Therapy - Charles M. Washington, Dennis T. Leaver - Google Libros [Internet]. Fourth edition. 2016 [cited 2020 Jun 17]. Available from: [https://books.google.es/books?id=N-h1BwAAQBAJ&pg=PA68&lpg=PA68&dq=bergoniè+y+tribondeau+\(1906\)+radiotherapy&source=bl&ots=-7ABDaMume&sig=ACfU3U1o0hngjAccfuFiyyGFh33ZTYV5hQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjlmfXGxonqAhUnDWMBHfEmCkYQ6AEwAXoECAsQAQ#v=onepage&q=bergoniè+y+tribondeau+\(1906\)+radiotherapy&f=false](https://books.google.es/books?id=N-h1BwAAQBAJ&pg=PA68&lpg=PA68&dq=bergoniè+y+tribondeau+(1906)+radiotherapy&source=bl&ots=-7ABDaMume&sig=ACfU3U1o0hngjAccfuFiyyGFh33ZTYV5hQ&hl=es&sa=X&ved=2ahUKEwjlmfXGxonqAhUnDWMBHfEmCkYQ6AEwAXoECAsQAQ#v=onepage&q=bergoniè+y+tribondeau+(1906)+radiotherapy&f=false)
  113. Withers HR. Four R's of radiotherapy. *Adv Radiat Biol* [Internet]. 1975 [cited 2020 Aug 11];5 pp. 241–247. Available from: [http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig\\_q=RN:7228292](http://inis.iaea.org/Search/search.aspx?orig_q=RN:7228292)
  114. Steel GG, Mcmillan TJ, Peacock JH. The 5Rs of Radiobiology. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 1989 [cited 2020 Jun 17];56(6):1045–8. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=irab20>
  115. Thames HD. On the origin of dose fractionation regimens in radiotherapy. *Semin Radiat Oncol*. 1992 Jan 1;2(1):3–9.
  116. Dutreix J. Fractionation in radiotherapy. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 1987 [cited 2020 Aug 11];52(6):975–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/09553008714552561>
  117. Douglas BG, Fowler JF. The Effect of Multiple Small Doses of X Rays on Skin Reactions in the Mouse and a Basic Interpretation. *Radiat Res* [Internet]. 2012 Aug [cited 2020 Jun 21];178(2):AV125–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22870964/>
  118. Russell NS, Bartelink H. Radiotherapy: The last 25 years. *Cancer Treat Rev*.

- 1999;25(6):365–76.
119. Voyant C, Julian D, Roustit R, Biffi K, Lantieri C. Biological effects and equivalent doses in radiotherapy: A software solution. *Reports Pract Oncol Radiother* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 27];19(1):47–55. Available from: </pmc/articles/PMC4055002/?report=abstract>
  120. Stewart RD, Yu VK, Georgakilas AG, Koumenis C, Han Park J, Carlson DJ. Effects of Radiation Quality and Oxygen on Clustered DNA Lesions and Cell Death. *Radiat Res* [Internet]. 2011 [cited 2020 Jun 28];176:587–602. Available from: <http://faculty.washington.edu/trawets/mclds/>.
  121. Gascoigne KE, Taylor SS. Cancer Cells Display Profound Intra- and Interline Variation following Prolonged Exposure to Antimitotic Drugs. *Cancer Cell*. 2008 Aug 12;14(2):111–22.
  122. Lara PC, López-Peñalver JJ, Farias V de A, Ruiz-Ruiz MC, Oliver FJ, Ruiz de Almodóvar JM. Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives. Vol. 356, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2015. p. 5–16.
  123. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* [Internet]. 2007 Jan 24 [cited 2020 Jun 28];13(1):54–61. Available from: <http://www.nature.com/articles/nm1523>
  124. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martínez D, Hernanz-Falcón P, et al. Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature* [Internet]. 2009 Apr 16 [cited 2020 Jun 28];458(7240):899–903. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19219027/>
  125. Ko A, Kanehisa A, Martins I, Senovilla L, Chargari C, Dugue D, et al. Autophagy inhibition radiosensitizes in vitro, yet reduces radioresponses in vivo due to deficient immunogenic signalling. *Cell Death Differ* [Internet]. 2014 Jan [cited 2020 Jun 28];21(1):92–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24037090/>
  126. Vakkila J, Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth [Internet]. Vol. 4, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2004 [cited 2020 Jun 28]. p. 641–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15286730/>
  127. Folkerts H, Hilgendorf S, Vellenga E, Bremer E, Wiersma VR. The multifaceted

- role of autophagy in cancer and the microenvironment. Vol. 39, Medicinal Research Reviews. John Wiley and Sons Inc.; 2019. p. 517–60.
128. Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HMW, Salumbides B, et al. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: The hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res*. 2006 Jan 15;12(2):634–42.
  129. Gameiro SR, Jammeh ML, Wattenberg MM, Tsang KY, Ferrone S, Hodge JW. Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killign. *Oncotarget* [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 28];5(2):403–16. Available from: [/pmc/articles/PMC3964216/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24125863/)
  130. Liu Y, Dong Y, Kong L, Shi F, Zhu H, Yu J. Abscopal effect of radiotherapy combined with immune checkpoint inhibitors [Internet]. Vol. 11, *Journal of Hematology and Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Aug 2]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30115069/>
  131. Siva S, MacManus MP, Martin RF, Martin OA. Abscopal effects of radiation therapy: A clinical review for the radiobiologist [Internet]. Vol. 356, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2015 [cited 2020 Aug 2]. p. 82–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24125863/>
  132. Soussi T, Béroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2001 [cited 2020 Jun 28];1(3):233–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902578/>
  133. Pawlik TM, Keyomarsi K. Role of cell cycle in mediating sensitivity to radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2004 Jul 15 [cited 2020 Nov 14];59(4):928–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15234026/>
  134. Song CW, Glatstein E, Marks LB, Emami B, Grimm J, Sperduto PW, et al. Biological Principles of Stereotactic Body Radiation Therapy (SBRT) and Stereotactic Radiation Surgery (SRS): Indirect Cell Death. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2019 [cited 2020 Jun 28]; Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30836165/>
  135. Palma DA, Olson R, Harrow S, Gaede S, Louie A V., Haasbeek C, et al. Stereotactic ablative radiotherapy versus standard of care palliative treatment in patients with oligometastatic cancers (SABR-COMET): a randomised, phase 2, open-label trial. *Lancet* [Internet]. 2019 May 18 [cited 2020 Jun 28];393(10185):2051–8. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30982687/>
136. Gomez DR, Tang C, Zhang J, Blumenschein GR, Hernandez M, Jack Lee J, et al. Local consolidative therapy vs. Maintenance therapy or observation for patients with oligometastatic non–small-cell lung cancer: Long-term results of a multi-institutional, phase II, randomized study. *J Clin Oncol*. 2019;37(18):1558–65.
  137. Franken NAP, ten Cate R, Krawczyk PM, Stap J, Haveman J, Aten J, et al. Comparison of RBE values of high- LET  $\alpha$ -particles for the induction of DNA-DSBs, chromosome aberrations and cell reproductive death. *Radiat Oncol* [Internet]. 2011 Jun 8 [cited 2020 Jun 28];6(1):64. Available from: <https://ro-journal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1748-717X-6-64>
  138. Pinto M, Prise KM, Michael BD. Evidence for Complexity at the Nanometer Scale of Radiation-Induced DNA DSBs as a Determinant of Rejoining Kinetics. *Radiat Res* [Internet]. 2005 Jul [cited 2020 Jun 28];164(1):73–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15966767/>
  139. Li L, Liu W-L, Su L, Lu Z-C, He X-S. The Role of Autophagy in Cancer Radiotherapy. *Curr Mol Pharmacol* [Internet]. 2020 Jan 15 [cited 2021 Jan 17];13(1):31–40. Available from: <http://www.eurekaselect.com/174241/article>
  140. Galluzzi L, Pedro JMBS, Demaria S, Formenti SC, Kroemer G. Activating autophagy to potentiate immunogenic chemotherapy and radiation therapy [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Jan 17]. p. 247–58. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2016.183>
  141. Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim EG, et al. Cellular Stress Responses in Radiotherapy [Internet]. Vol. 8, *Cells*. NLM (Medline); 2019 [cited 2021 Jan 21]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31540530/>
  142. Gewirtz DA, Hilliker ML, Wilson EN. Promotion of autophagy as a mechanism for radiation sensitization of breast tumor cells. Vol. 92, *Radiotherapy and Oncology*. *Radiother Oncol*; 2009. p. 323–8.
  143. Wu S-Y, Liu Y-W, Wang Y-K, Lin T-H, Li Y-Z, Chen S-H, et al. Ionizing radiation induces autophagy in human oral squamous cell carcinoma [Internet]. [cited 2020 Jun 7]. Available from: [www.jbuon.com](http://www.jbuon.com)
  144. Saglar E, Unlu S, Babalioglu I, Gokce SC, Mergen H. Assessment of ER stress and autophagy induced by ionizing radiation in both radiotherapy patients and ex vivo irradiated samples. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan

- 9];28(9):413–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24888459/>
145. Huang YH, Yang PM, Chuah QY, Lee YJ, Hsieh YF, Peng CW, et al. Autophagy promotes radiation-induced senescence but inhibits bystander effects in human breast cancer cells. *Autophagy* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 9];10(7):1212–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24813621/>
146. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs [Internet]. Vol. 22, *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Jan 21]. p. 377–88. Available from: </pmc/articles/PMC4326572/?report=abstract>
147. Chaurasia M, Gupta S, Das A, Dwarakanath BS, Simonsen A, Sharma K. Radiation induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 mediated pro-survival autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2019 Aug 3 [cited 2020 Oct 25];15(8):1391–406. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15548627.2019.1582973>
148. Classen F, Kranz P, Riffkin H, Pomsch M, Wolf A, Göpelt K, et al. Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells. *Exp Cell Res*. 2019 Jan 1;374(1):29–37.
149. Gewirtz DA. The Autophagic Response to Radiation: Relevance for Radiation Sensitization in Cancer Therapy. *Radiat Res* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2020 Oct 25];182(4):363–7. Available from: <http://www.bioone.org/doi/10.1667/RR13774.1>
150. Kim KW, Moretti L, Mitchell LR, Jung DK, Lu B. Endoplasmic reticulum stress mediates radiation-induced autophagy by perk-eIF2 $\alpha$  in caspase-3/7-deficient cells. *Oncogene*. 2010 Jun 3;29(22):3241–51.
151. Classen F, Kranz P, Riffkin H, Pomsch M, Wolf A, Göpelt K, et al. Autophagy induced by ionizing radiation promotes cell death over survival in human colorectal cancer cells. *Exp Cell Res* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2020 Oct 25];374(1):29–37. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.11.004>
152. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2020 Sep 12];99(3):287–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21722986/>
153. Kepp O, Tartour E, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus guidelines for the detection of immunogenic cell death [Internet]. Vol. 3,

- OncoImmunology. Taylor and Francis Inc.; 2014 [cited 2021 Jan 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25941621/>
154. Golden EB, Pellicciotta I, Demaria S, Barcellos-Hoff MH, Formenti SC. The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways [Internet]. Vol. 2 AUG, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Research Foundation; 2012 [cited 2021 Jan 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22891162/>
  155. Garg AD, Dudek AM, Ferreira GB, Verfaillie T, Vandenabeele P, Krysko D V., et al. ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 9];9(9):1292–307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23800749/>
  156. Smith J, Mun Tho L, Xu N, A. Gillespie D. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. In: *Advances in Cancer Research* [Internet]. Academic Press Inc.; 2010 [cited 2021 Jan 10]. p. 73–112. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21034966/>
  157. Liang N, Jia L, Liu Y, Liang B, Kong D, Yan M, et al. ATM pathway is essential for ionizing radiation-induced autophagy. *Cell Signal* [Internet]. 2013 [cited 2021 Jan 10];25(12):2530–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23993957/>
  158. Fei P, El-Deiry WS. P53 and radiation responses [Internet]. Vol. 22, *Oncogene*. Oncogene; 2003 [cited 2021 Jan 10]. p. 5774–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12947385/>
  159. Li M, Brooks CL, Wu-Baer F, Chen D, Baer R, Gu W. Mono- Versus Polyubiquitination: Differential Control of p53 Fate by Mdm2. *Science* (80- ) [Internet]. 2003 Dec 12 [cited 2021 Jan 10];302(5652):1972–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14671306/>
  160. Tang J, Di J, Cao H, Bai J, Zheng J. p53-mediated autophagic regulation: A prospective strategy for cancer therapy [Internet]. Vol. 363, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2015 [cited 2021 Jan 10]. p. 101–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25896632/>
  161. Maiuri MC, Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Malik SA, Kroemer G. Autophagy regulation by p53. Vol. 22, *Current Opinion in Cell Biology*. 2010. p. 181–5.
  162. White E. Autophagy and p53. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 Apr 1;6(4).
  163. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and

- mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jun 7 [cited 2021 Jan 10];102(23):8204–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15928081/>
164. Tsai W Bin, Chung YM, Takahashi Y, Xu Z, Hu MCT. Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2008 [cited 2021 Jan 10];10(4):460–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18344987/>
  165. Yang JY, Xia W, Hu MCT. Ionizing radiation activates expression of FOXO3a, Fas ligand, and Bim, and induces cell apoptosis. *Int J Oncol* [Internet]. 2006 [cited 2021 Jan 10];29(3):643–8. Available from: </pmc/articles/PMC2632978/?report=abstract>
  166. Tarrade S, Bhardwaj T, Flegel M, Bertrand L, Velegzhaninov I, Moskalev A, et al. Histone H2AX Is Involved in FoxO3a-Mediated transcriptional responses to ionizing radiation to maintain genome stability. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2015 Dec 16 [cited 2021 Jan 10];16(12):29996–30014. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26694365/>
  167. Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ, DiStefano PS, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* (80- ) [Internet]. 2002 Apr 19 [cited 2021 Jan 10];296(5567):530–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11964479/>
  168. Paglin S, Lee NY, Nakar C, Fitzgerald M, Plotkin J, Deuel B, et al. Rapamycin-sensitive pathway regulates mitochondrial membrane potential, autophagy, and survival in irradiated MCF-7 cells. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2021 Jan 16];65(23):11061–70. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/>
  169. Suffixidharan S, Jain K, Basu A. Regulation of autophagy by kinases [Internet]. Vol. 3, *Cancers*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2011 [cited 2021 Jan 16]. p. 2630–54. Available from: </pmc/articles/PMC3757434/?report=abstract>
  170. Bode JG, Ehrling C, Häussinger D. The macrophage response towards LPS and its control through the p38 MAPK-STAT3 axis [Internet]. Vol. 24, *Cellular Signalling*. *Cell Signal*; 2012 [cited 2021 Jan 16]. p. 1185–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22330073/>
  171. Lien SC, Chang SF, Lee PL, Wei SY, Chang MDT, Chang JY, et al. Mechanical

- regulation of cancer cell apoptosis and autophagy: Roles of bone morphogenetic protein receptor, Smad1/5, and p38 MAPK. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2013 Dec [cited 2021 Jan 16];1833(12):3124–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24021264/>
172. Sui X, Kong N, Ye L, Han W, Zhou J, Zhang Q, et al. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents [Internet]. Vol. 344, *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2014 [cited 2021 Jan 16]. p. 174–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24333738/>
173. Gu Q, He Y, Ji J, Yao Y, Shen W, Luo J, et al. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) and reactive oxygen species (ROS) mediates radiation-induced invasiveness through the SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 pathway in non-small cell lung carcinoma cells. *Oncotarget* [Internet]. 2015 Mar 12 [cited 2021 Jan 16];6(13):10893–907. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget/](http://www.impactjournals.com/oncotarget/)
174. Harada H. Hypoxia-inducible factor 1-mediated characteristic features of cancer cells for tumor radioresistance. In: *Journal of Radiation Research* [Internet]. Oxford University Press; 2016 [cited 2021 Jan 16]. p. i99–105. Available from: </pmc/articles/PMC4990106/?report=abstract>
175. 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* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jan 16];33(4):1036–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732598/>
176. Kobliakov VA. Mechanisms of tumor promotion by reactive oxygen species. *Biochem* [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Jan 16];75(6):675–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20636258/>
177. Poillet-Perez L, Despouy G, Delage-Mourroux R, Boyer-Guittaut M. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy [Internet]. Vol. 4, *Redox Biology*. Elsevier B.V.; 2015 [cited 2021 Jan 9]. p. 184–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25590798/>
178. Kam WWY, Banati RB. Effects of ionizing radiation on mitochondria [Internet]. Vol. 65, *Free Radical Biology and Medicine*. *Free Radic Biol Med*; 2013 [cited 2021 Jan 9]. p. 607–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23892359/>
179. Zhang B, Davidson MM, Zhou H, Wang C, Walker WF, Hei TK. Cytoplasmic

- irradiation results in mitochondrial dysfunction and DRP1-dependent mitochondrial fission. *Cancer Res* [Internet]. 2013 Nov 15 [cited 2021 Jan 9];73(22):6700–10. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/>
180. Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle* [Internet]. 2016 Apr 17 [cited 2021 Jan 9];15(8):1099–107. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26940879/>
181. Shimura T, Sasatani M, Kamiya K, Kawai H, Inaba Y, Kunugita N. Mitochondrial reactive oxygen species perturb AKT/cyclin D1 cell cycle signaling via oxidative inactivation of PP2A in lowdose irradiated human fibroblasts. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Dec 9 [cited 2021 Jan 9];7(3):3559–70. Available from: [www.impactjournals.com/oncotarget](http://www.impactjournals.com/oncotarget)
182. Zhang B, Wang Y, Pang X, Su Y, Ai G, Wang T. ER stress induced by ionising radiation in IEC-6 cells. *Int J Radiat Biol* [Internet]. 2010 Jun [cited 2021 Jan 9];86(6):429–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20470193/>
183. Li F, Zheng X, Liu Y, Li P, Liu X, Ye F, et al. Different Roles of CHOP and JNK in Mediating Radiation-Induced Autophagy and Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Radiat Res* [Internet]. 2016 May 2 [cited 2021 Jan 9];185(5):539. Available from: <https://bioone.org/journals/radiation-research/volume-185/issue-5/RR14344.1/Different-Roles-of-CHOP-and-JNK-in-Mediating-Radiation-Induced/10.1667/RR14344.1.full>
184. Chiu HW, Fang WH, Chen YL, Wu M Der, Yuan GF, Ho SY, et al. Monascupiloin enhances the radiation sensitivity of human prostate cancer cells by stimulating endoplasmic reticulum stress and inducing autophagy. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jul 3 [cited 2021 Jan 9];7(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22802963/>
185. Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O’Toole E, Winey M, Goldfarb DS. Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* [Internet]. 2003 Jan 1 [cited 2021 Jan 23];14(1):129–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12529432/>
186. Krick R, Mühe Y, Prick T, Bredschneider M, Bremer S, Wenzel D, et al. Piecemeal microautophagy of the nucleus: Genetic and morphological traits. *Autophagy* [Internet]. 2009 Feb 16 [cited 2021 Jan 23];5(2):270–2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19182523/>

187. Hernández-Corbacho MJ, Salama MF, Canals D, Senkal CE, Obeid LM. Sphingolipids in mitochondria. Vol. 1862, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. Elsevier B.V.; 2017. p. 56–68.
188. Patwardhan GA, Beverly LJ, Siskind LJ. Sphingolipids and mitochondrial apoptosis. *J Bioenerg Biomembr*. 2016 Apr 1;48(2):153–68.
189. Aureli M, Murdica V, Loberto N, Samarani M, Prinetti A, Bassi R, et al. Exploring the link between ceramide and ionizing radiation. *Glycoconj J* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2021 Jan 9];31(6):449–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25129488/>
190. Peralta ER, Edinger AL. Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy. *Autophagy* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Jan 9];5(3):407–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19202357/>
191. Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Nov 11 [cited 2021 Jan 9];105(45):17402–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18981422/>
192. Edinger AL. Starvation in the midst of plenty: Making sense of ceramide-induced autophagy by analysing nutrient transporter expression. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jan 9];37(1):253–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19143642/>
193. Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Panneer Selvam S, et al. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jan 16];8(10):831–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22922758/>
194. Dany M, Ogretmen B. Ceramide induced mitophagy and tumor suppression [Internet]. Vol. 1853, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier; 2015 [cited 2021 Jan 16]. p. 2834–45. Available from: </pmc/articles/PMC4515393/?report=abstract>
195. Corre I, Niaudet C, Paris F. Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation [Internet]. Vol. 704, *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*. *Mutat Res*; 2010 [cited 2021 Jan 9]. p. 61–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20117234/>
196. La Rovere RML, Roest G, Bultynck G, Parys JB. Intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling and Ca<sup>2+</sup> microdomains in the control of cell survival, apoptosis and autophagy

- [Internet]. Vol. 60, Cell Calcium. Elsevier Ltd; 2016 [cited 2021 Jan 9]. p. 74–87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27157108/>
197. West AC, Johnstone RW. New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. Vol. 124, Journal of Clinical Investigation. 2014. p. 30–9.
  198. Singh AK, Bishayee A, Pandey AK. Targeting histone deacetylases with natural and synthetic agents: An emerging anticancer strategy. Vol. 10, Nutrients. MDPI AG; 2018.
  199. Eckschlager T, Plch J, Stiborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. Vol. 18, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2017.
  200. Mrakovcic M, Bohner L, Hanisch M, Fröhlich LF. Epigenetic targeting of autophagy via HDAC inhibition in tumor cells: Role of p53. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018.
  201. Hanikoglu A, Hanikoglu F, Ozben T. Natural Product Inhibitors of Histone Deacetylases as New Anticancer Agents. *Curr Protein Pept Sci*. 2018 Jan 5;19(3).
  202. Olzscha H, Bekheet ME, Sheikh S, La Thangue NB. HDAC Inhibitors. *Methods Mol Biol*. 2016;1436:281–303.
  203. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. CLINICAL DEVELOPMENT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS AS ANTICANCER AGENTS \*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* [Internet]. 2005 [cited 2020 May 19];45:495–528. Available from: [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)
  204. Mrakovcic M, Kleinheinz J, Fröhlich LF. P53 at the crossroads between different types of hdac inhibitor-mediated cancer cell death. *Int J Mol Sci*. 2019 May 2;20(10).
  205. Hutt DM, Roth DM, Marchal C, Bouchecareilh M. Using histone deacetylase inhibitors to analyze the relevance of HDACs for translation. In: *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc.; 2017. p. 77–91.
  206. Ellis L, Hammers H, Pili R. Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. Vol. 280, *Cancer Letters*. 2009. p. 145–53.
  207. Di Marcotullio L, Canettieri G, Infante P, Greco A, Gulino A. Protected from the inside: Endogenous histone deacetylase inhibitors and the road to cancer. Vol. 1815, *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. *Biochim Biophys Acta*; 2011. p. 241–52.
  208. Garmpis A, Garmpis N, Damaskos C, Valsami S, Spartalis E, Lavaris A, et al.

- Histone deacetylase inhibitors as a new anticancer option: How far can we go with expectations? *JBUON*. 2018;23(4):846–61.
209. Shi B. The development and potential clinical utility of biomarkers for HDAC inhibitors. *Drug Discov Ther*. 2013;
210. Hoshino I, Matsubara H. Recent advances in histone deacetylase targeted cancer therapy. Vol. 40, *Surgery Today*. 2010. p. 809–15.
211. Mrakovcic M, Kleinheinz J, Fröhlich LF. Histone deacetylase inhibitor-induced autophagy in tumor cells: Implications for p53. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
212. Schäfer C, Göder A, Beyer M, Kiweler N, Mahendrarajah N, Rauch A, et al. Class I histone deacetylases regulate p53/NF- $\kappa$ B crosstalk in cancer cells. *Cell Signal*. 2017 Jan 1;29:218–25.
213. Gammoh N, Lam D, Puente C, Ganley I, Marks PA, Jiang X. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Apr 24 [cited 2020 Oct 25];109(17):6561–5. Available from: [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1204429109](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1204429109)
214. West AC, Smyth MJ, Johnstone RW. The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system. *Oncoimmunology* [Internet]. 2014 [cited 2020 Oct 18];3(1). Available from: [/pmc/articles/PMC3962507/?report=abstract](http://pmc/articles/PMC3962507/?report=abstract)
215. Skov S, Pedersen MT, Andresen L, Straten PT, Woetmann A, Ødum N. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res* [Internet]. 2005 Dec 1 [cited 2020 Oct 18];65(23):11136–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16322264/>
216. Hull EE, Montgomery MR, Leyva KJ. HDAC Inhibitors as Epigenetic Regulators of the Immune System: Impacts on Cancer Therapy and Inflammatory Diseases [Internet]. Vol. 2016, *BioMed Research International*. Hindawi Limited; 2016 [cited 2020 Oct 18]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27556043/>
217. Shao W, Growney JD, Feng Y, O'Connor G, Pu M, Zhu W, et al. Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. *Int J Cancer*. 2010 Nov 1;127(9):2199–208.

218. Garnock-Jones KP. Panobinostat: First global approval [Internet]. Vol. 75, *Drugs*. Springer International Publishing; 2015 [cited 2020 Nov 14]. p. 695–704. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25837990/>
219. Ocio EM, Vilanova D, Atadja P, Maiso P, Crusoe E, Fernández-Lázaro D, et al. In vitro and in vivo rationale for the triple combination of panobinostat (LBH589) and dexamethasone with either bortezomib or lenalidomide in multiple myeloma. *Haematologica* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Nov 14];95(5):794–803. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951978/>
220. Haefner M, Bluethner T, Niederhagen M, Moebius C, Wittekind C, Mossner J, et al. Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2008 [cited 2020 Aug 14];14(23):3681–92. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9324/wjg/v14/i23/3681.htm>
221. Jiang P Du, Zhao YL, Deng XQ, Mao YQ, Shi W, Tang QQ, et al. Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomed Pharmacother*. 2010 Nov;64(9):609–14.
222. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018 Aug 3;14(8):1435–55.
223. Verbaanderd C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, et al. Repurposing drugs in oncology (ReDO) - Chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedicinescience* [Internet]. 2017 Nov 23 [cited 2020 Nov 18];11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29225688/>
224. Zhao H, Cai Y, Santi S, Lafrenie R, Lee H. Chloroquine-Mediated Radiosensitization is due to the Destabilization of the Lysosomal Membrane and Subsequent Induction of Cell Death by Necrosis. *Radiat Res*. 2005 Sep;164(3):250–7.
225. Pellegrini P, Strambi A, Zipoli C, Hägg-Olofsson M, Buoncervello M, Linder S, et al. Acidic extracellular pH neutralizes the autophagy-inhibiting activity of chloroquine: Implications for cancer therapies. *Autophagy* [Internet]. 2014 Apr 14 [cited 2020 May 19];10(4):562–71. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.4161/auto.27901>
226. Sasaki K, Tsuno NH, Sunami E, Tsurita G, Kawai K, Okaji Y, et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells. *BMC*

- Cancer. 2010 Jul 15;10(1):1–11.
227. Manic G, Obrist F, Kroemer G, Vitale I, Galluzzi L. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. Vol. 1, Molecular and Cellular Oncology. Taylor and Francis Ltd.; 2014.
228. Zou Y, Ling YH, Sironi J, Schwartz EL, Perez-Soler R, Piperdi B. The autophagy inhibitor chloroquine overcomes the innate resistance of wild-type EGFR non-small-cell lung cancer cells to erlotinib. *J Thorac Oncol*. 2013 Jun 1;8(6):693–702.
229. Wang Y, Peng RQ, Li DD, Ding Y, Wu XQ, Zeng YX, et al. Chloroquine enhances the cytotoxicity of topotecan by inhibiting autophagy in lung cancer cells. *Chin J Cancer*. 2011;30(10):690–700.
230. Kim SH, Kim JH, Fried J. Enhancement of the radiation response of cultured tumor cells by chloroquine. *Cancer* [Internet]. 1973 Sep 1 [cited 2020 Aug 12];32(3):536–40. Available from: <https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/1097-0142%28197309%2932%3A3%3C536%3A%3AAID-CNCR2820320304%3E3.0.CO%3B2-E>
231. Djordevic B, Lange CS, Rotman M. Potentiation of radiation lethality in mouse melanoma cells by mild hyperthermia and chloroquine. *Melanoma Res* [Internet]. 1992 Dec 1 [cited 2020 Jun 14];2(5):321–6. Available from: <http://journals.lww.com/00008390-199212000-00005>
232. Papadopoulou M V., Ji M, Rao MK, Bloomer WD. 4-[3-(2-nitro-1-imidazolyl)propylamino]-7-chloroquinoline hydrochloride (NLCQ-1), a novel bioreductive compound as a hypoxia-selective cytotoxin. *Oncol Res*. 2000;12(4):185–92.
233. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method [Internet]. Vol. 70, *Cancer Research*. *Cancer Res*; 2010 [cited 2020 Jul 23]. p. 440–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20068163/>
234. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72(1–2):248–54.
235. Chaachouay H, Ohneseit P, Toulany M, Kehlbach R, Multhoff G, Rodemann HP. Autophagy contributes to resistance of tumor cells to ionizing radiation. *Radiother Oncol* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2020 Sep 12];99(3):287–92. Available from:

- <http://www.thegreenjournal.com/article/S0167814011003124/fulltext>
236. Chiu HW, Yeh YL, Ho SY, Wu YH, Wang BJ, Huang WJ, et al. A new histone deacetylase inhibitor enhances radiation sensitivity through the induction of misfolded protein aggregation and autophagy in triple-negative breast cancer. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2020 Oct 31];11(11):11. Available from: [/pmc/articles/PMC6896096/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34888888/)
  237. Chaurasia M, Bhatt AN, Das A, Dwarakanath BS, Sharma K. Radiation-induced autophagy: Mechanisms and consequences [Internet]. Vol. 50, *Free Radical Research*. Taylor and Francis Ltd; 2016 [cited 2020 Nov 2]. p. 273–90. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10715762.2015.1129534>
  238. Palumbo S, Comincini S. Autophagy and ionizing radiation in tumors: The “survive or not survive” dilemma. *J Cell Physiol* [Internet]. 2013 Jan 1 [cited 2020 Nov 2];228(1):1–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.24118>
  239. Apel A, Herr I, Schwarz H, Rodemann HP, Mayer A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res*. 2008 Mar 1;68(5):1485–94.
  240. Zhuang W, Qin Z, Liang Z. The role of autophagy in sensitizing malignant glioma cells to radiation therapy [Internet]. Vol. 41, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai); 2009 [cited 2020 Aug 23]. p. 341–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19430698/>
  241. Marinković M, Šprung M, Buljubašić M, Novak I. Autophagy modulation in cancer: Current knowledge on action and therapy. Vol. 2018, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. Hindawi Limited; 2018.
  242. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Influence of autophagy on the efficacy of radiotherapy [Internet]. Vol. 12, *Radiation Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2017 [cited 2020 Nov 2]. p. 1–10. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13014-017-0795-y>
  243. Falcão PL, Motta BM, de Lima FC, Lima CV, Campos TPR. Enhancement of viability of radiosensitive (PBMC) and resistant (MDA-MB-231) clones in low-dose-rate cobalt-60 radiation therapy. *Radiol Bras* [Internet]. 2015 Jul 23 [cited 2020 Nov 8];48(3):158–65. Available from: [/pmc/articles/PMC4492568/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26188888/)
  244. Cai Y, Zhao H, Lee H. Chloroquine increased radiosensitivity of radioresistant MDA-MB 231 cells and its molecular mechanism. *Beijing Da Xue Xue Bao*

- [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2020 Nov 8];38(4):411–4. Available from: <https://europepmc.org/article/med/16892149>
245. Savage KI, Harkin DP. BRCA1, a “complex” protein involved in the maintenance of genomic stability [Internet]. Vol. 282, FEBS Journal. Blackwell Publishing Ltd; 2015 [cited 2020 Dec 27]. p. 630–46. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25400280/>
246. Zhang J, Powell SN. The role of the BRCA1 tumor suppressor in DNA double-strand break repair [Internet]. Vol. 3, Molecular Cancer Research. Mol Cancer Res; 2005 [cited 2020 Dec 27]. p. 531–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16254187/>
247. Wang H, Yang ES, Jiang J, Nowsheen S, Xia F. DNA damage-induced cytotoxicity is dissociated from BRCA1’s DNA repair function but is dependent on its cytosolic accumulation. Cancer Res [Internet]. 2010 Aug 1 [cited 2020 Dec 27];70(15):6258–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20631074/>
248. Gurtner K, Kryzmien Z, Koi L, Wang M, Benes CH, Hering S, et al. Radioresistance of KRAS/TP53-mutated lung cancer can be overcome by radiation dose escalation or EGFR tyrosine kinase inhibition *in vivo*. Int J Cancer [Internet]. 2020 Jul 15 [cited 2020 Dec 28];147(2):472–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ijc.32598>
249. Dinkelborg PH, Wang M, Gheorghiu L, Gurski JM, Hong TS, Benes CH, et al. A common Chk1-dependent phenotype of DNA double-strand break suppression in two distinct radioresistant cancer types. Breast Cancer Res Treat [Internet]. 2019 Apr 30 [cited 2020 Dec 28];174(3):605–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30607635/>
250. Sklar MD. The ras oncogenes increase the intrinsic resistance of NIH 3T3 cells to ionizing radiation. Science (80- ) [Internet]. 1988 Feb 5 [cited 2020 Dec 28];239(4840):645–7. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/239/4840/645>
251. Wang M, Han J, Marcar L, Black J, Liu Q, Li X, et al. Radiation resistance in KRAS-mutated lung cancer is enabled by stem-like properties mediated by an osteopontin-EGFR pathway. Cancer Res [Internet]. 2017 Apr 15 [cited 2020 Dec 28];77(8):2018–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28202526/>
252. Skoulidis F, Byers LA, Diao L, Papadimitrakopoulou VA, Tong P, Izzo J, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung

- adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Aug 1 [cited 2020 Dec 28];5(8):861–78. Available from: [/pmc/articles/PMC4527963/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25721111/)
253. Sharda A, Rashid M, Shah SG, Sharma AK, Singh SR, Gera P, et al. Elevated HDAC activity and altered histone phospho-acetylation confer acquired radio-resistant phenotype to breast cancer cells. *Clin Epigenetics* [Internet]. 2020 Jan 3 [cited 2020 Nov 27];12(1):4. Available from: <https://clinicalepigeneticsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13148-019-0800-4>
  254. Amaravadi RK, Kimmelman AC, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: Recent advances and future directions [Internet]. Vol. 9, *Cancer Discovery*. American Association for Cancer Research Inc.; 2019 [cited 2021 Feb 27]. p. 1167–81. Available from: [www.aacrjournals.org](http://www.aacrjournals.org)
  255. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer [Internet]. Vol. 17, *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group; 2017 [cited 2021 Feb 27]. p. 528–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28751651/>
  256. Zhao H, Cai Y, Santi S, Lafrenie R, Lee H. Chloroquine-Mediated Radiosensitization is due to the Destabilization of the Lysosomal Membrane and Subsequent Induction of Cell Death by Necrosis. *Radiat Res*. 2005 Sep 1;164(3):250–7.
  257. Koukourakis MI, Kalamida D, Mitrakas A, Pouliliou S, Kalamida S, Sivridis E, et al. Intensified autophagy compromises the efficacy of radiotherapy against prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 May 8;461(2):268–74.
  258. Chatterjee P, Choudhary GS, Sharma A, Singh K, Heston WD, Ciezki J, et al. PARP Inhibition Sensitizes to Low Dose-Rate Radiation TMPRSS2-ERG Fusion Gene-Expressing and PTEN-Deficient Prostate Cancer Cells. Tofilon PJ, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Apr 2 [cited 2020 Dec 28];8(4):e60408. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0060408>
  259. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S, Cao X, Yu J, Helgeson BE, et al. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* [Internet]. 2008 [cited 2020 Dec 28];10(2):177–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18283340/>
  260. Sun C, Dobi A, Mohamed A, Li H, Thangapazham RL, Furusato B, et al. TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates

- C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation. *Oncogene* [Internet]. 2008 Sep 11 [cited 2020 Dec 28];27(40):5348–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18542058/>
261. Swanson TA, Krueger SA, Galoforo S, Thibodeau BJ, Martinez AA, Wilson GD, et al. TMPRSS2/ERG fusion gene expression alters chemo- and radio-responsiveness in cell culture models of androgen independent prostate cancer. *Prostate* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2020 Dec 28];71(14):1548–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21394739/>
  262. Fitzgerald TJ, Simon E, Meyer J. Prostate carcinoma: Opportunities for translational research [Internet]. Vol. 91, *Journal of Cellular Biochemistry. J Cell Biochem*; 2004 [cited 2020 Dec 27]. p. 433–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14755675/>
  263. Simon EL, Goel HL, Teider N, Wang T, Languino LR, Fitzgerald TJ. High dose fractionated ionizing radiation inhibits prostate cancer cell adhesion and  $\beta 1$  integrin expression. *Prostate* [Internet]. 2005 Jun 15 [cited 2020 Dec 27];64(1):83–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15651037/>
  264. Stuschke M, Thames HD. Fractionation sensitivities and dose-control relations of head and neck carcinomas: Analysis of the randomized hyperfractionation trials. *Radiother Oncol* [Internet]. 1999 May 1 [cited 2020 Nov 7];51(2):113–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10435801/>
  265. van Leeuwen CM, Oei AL, Crezee J, Bel A, Franken NAP, Stalpers LJA, et al. The alfa and beta of tumours: A review of parameters of the linear-quadratic model, derived from clinical radiotherapy studies [Internet]. Vol. 13, *Radiation Oncology*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2020 Nov 7]. Available from: </pmc/articles/PMC5956964/?report=abstract>
  266. Fowler JF. The radiobiology of prostate cancer including new aspects of fractionated radiotherapy. In: *Acta Oncologica* [Internet]. *Acta Oncol*; 2005 [cited 2020 Dec 27]. p. 265–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16076699/>
  267. Xiao W, Graham PH, Hao J, Chang L, Ni J, Power CA, et al. Combination Therapy with the Histone Deacetylase Inhibitor LBH589 and Radiation Is an Effective Regimen for Prostate Cancer Cells. *PLoS One* [Internet]. 2013 Aug 26 [cited 2020 Nov 27];8(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23991216/>
  268. Hu YL, Jahangiri A, DeLay M, Aghi MK. Tumor cell autophagy as an adaptive

- response mediating resistance to treatments such as antiangiogenic therapy [Internet]. Vol. 72, *Cancer Research*. *Cancer Res*; 2012 [cited 2020 Nov 14]. p. 4294–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22915758/>
269. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Øvervatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* [Internet]. 2005 Nov 21 [cited 2020 Nov 14];171(4):603–14. Available from: </pmc/articles/PMC2171557/?report=abstract>
  270. Moscat J, Diaz-Meco MT. p62 at the Crossroads of Autophagy, Apoptosis, and Cancer [Internet]. Vol. 137, *Cell*. NIH Public Access; 2009 [cited 2020 Oct 31]. p. 1001–4. Available from: </pmc/articles/PMC3971861/?report=abstract>
  271. Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy [Internet]. Vol. 584, *FEBS Letters*. *FEBS Lett*; 2010 [cited 2020 Oct 31]. p. 1374–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20153326/>
  272. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Arozana AA, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Vol. 12, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2016. p. 1–222.
  273. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy\*[S]. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Aug 17 [cited 2020 Nov 14];282(33):24131–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17580304/>
  274. Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human [Internet]. Vol. 3, *Autophagy*. Taylor and Francis Inc.; 2007 [cited 2020 Nov 14]. p. 181–206. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17224625/>
  275. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research [Internet]. Vol. 140, *Cell*. *Cell*; 2010 [cited 2020 Nov 14]. p. 313–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20144757/>
  276. Khan O, La Thangue NB. HDAC inhibitors in cancer biology: Emerging mechanisms and clinical applications [Internet]. Vol. 90, *Immunology and Cell Biology*. *Immunol Cell Biol*; 2012 [cited 2020 Nov 14]. p. 85–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22124371/>
  277. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer

- [Internet]. Vol. 1, Molecular Oncology. Mol Oncol; 2007 [cited 2020 Nov 14]. p. 19–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19383284/>
278. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. Nat Genet [Internet]. 2005 Apr [cited 2020 Nov 14];37(4):391–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15765097/>
279. Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004 Dec 28 [cited 2020 Oct 31];101(52):18030–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15596714/>
280. Andreu Vieyra C V., Berenson JR. The potential of panobinostat as a treatment option in patients with relapsed and refractory multiple myeloma [Internet]. Vol. 5, Therapeutic Advances in Hematology. SAGE Publications; 2014 [cited 2020 Nov 14]. p. 197–210. Available from: </pmc/articles/PMC4250267/?report=abstract>
281. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): Successes and challenges [Internet]. Vol. 280, Cancer Letters. Elsevier Ireland Ltd; 2009 [cited 2020 Nov 14]. p. 233–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19344997/>
282. Li J, Li G, Xu W. Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Strategy for Cancer Therapy. Curr Med Chem [Internet]. 2013 Apr 8 [cited 2020 Nov 21];20(14):1858–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23276137/>
283. 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 [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 14];11(4):973–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22367781/>
284. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. Vol. 27, Oncogene. 2008. p. 6434–51.
285. Solitro AR, Mackeigan JP. Leaving the lysosome behind: Novel developments in autophagy inhibition [Internet]. Vol. 8, Future Medicinal Chemistry. Future Science; 2016 [cited 2020 Nov 2]. p. 73–86. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26689099/>

286. Kroemer G, Jäättelä M. Lysosomes and autophagy in cell death control [Internet]. Vol. 5, Nature Reviews Cancer. Nat Rev Cancer; 2005 [cited 2020 Nov 14]. p. 886–97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16239905/>
287. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, Timmer W, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment [Internet]. Vol. 17, Clinical Cancer Research. Clin Cancer Res; 2011 [cited 2020 Nov 21]. p. 654–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21325294/>
288. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, et al. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. Autophagy [Internet]. 2018 Aug 3 [cited 2020 Oct 31];14(8):1435–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29940786/>
289. Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. Autophagy [Internet]. 2012 [cited 2020 Oct 31];8(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22252008/>
290. Jiang P Du, Zhao YL, Shi W, Deng XQ, Xie G, Mao YQ, et al. Cell growth inhibition, G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest, and apoptosis induced by chloroquine in human breast cancer cell line Bcap-37. Cell Physiol Biochem [Internet]. 2008 [cited 2020 Nov 2];22(5–6):431–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19088425/>
291. Liu L, Han C, Yu H, Zhu W, Cui H, Zheng L, et al. Chloroquine inhibits cell growth in human A549 lung cancer cells by blocking autophagy and inducing mitochondrial-mediated apoptosis. Oncol Rep [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Nov 2];39(6):2807–16. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2018.6363/abstract>
292. 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 [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Nov 16];35(1):43–9. Available from: </pmc/articles/PMC4699623/?report=abstract>
293. Enzenmüller S, Gonzalez P, Debatin KM, Fulda S. Chloroquine overcomes resistance of lung carcinoma cells to the dual PI3K/mTOR inhibitor PI103 by lysosome-mediated apoptosis. Anticancer Drugs. 2013;24:14–9.
294. Geng Y, Kohli L, Klocke BJ, Roth KA. Chloroquine-induced autophagic vacuole

- accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. *Neuro Oncol* [Internet]. 2010 May [cited 2020 Nov 14];12(5):473–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20406898/>
295. Fan C, Wang W, Zhao B, Zhang S, Miao J. Chloroquine inhibits cell growth and induces cell death in A549 lung cancer cells. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2020 Nov 14];14(9):3218–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16413786/>
296. Ye H, Chen M, Cao F, Huang H, Zhan R, Zheng X. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurol* [Internet]. 2016 Sep 20 [cited 2020 Sep 12];16(1). Available from: [/pmc/articles/PMC5029068/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27029068/)
297. Growney JD, Atadja P, Shao W, Wang Y, Pu M, Firestone B, et al. Efficacy of Panobinostat (LBH589) in Multiple Myeloma Cell Lines and In Vivo Mouse Model: Tumor-Specific Cytotoxicity and Protection of Bone Integrity in Multiple Myeloma. *Blood*. 2007 Nov 16;110(11):1510–1510.
298. Regel I, Merkl L, Friedrich T, Burgermeister E, Zimmermann W, Einwächter H, et al. Pan-histone deacetylase inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 21];143(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22465428/>
299. Mehdi O, Françoise S, Sofia CL, Urs G, Kevin Z, Bernard S, et al. HDAC gene expression in pancreatic tumor cell lines following treatment with the HDAC inhibitors panobinostat (LBH589) and trichostatine (TSA). *Pancreatolgy* [Internet]. 2012 [cited 2020 Nov 21];12(2):146–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22487525/>
300. Garrett LA, Growdon WB, Rueda BR, Foster R. Influence of a novel histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) on the growth of ovarian cancer. *J Ovarian Res* [Internet]. 2016 Sep 15 [cited 2020 Nov 25];9(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27633667/>
301. Mosleh M, Safaroghli-Azar A, Bashash D. Pan-HDAC inhibitor panobinostat, as a single agent or in combination with PI3K inhibitor, induces apoptosis in APL cells: An emerging approach to overcome MSC-induced resistance. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020 May 1;122:105734.
302. Lemoine M, Derenzini E, Buglio D, Medeiros LJ, Davis RE, Zhang J, et al. The

- pan-deacetylase inhibitor panobinostat induces cell death and synergizes with everolimus in Hodgkin lymphoma cell lines. *Blood* [Internet]. 2012 Apr 19 [cited 2020 Nov 25];119(17):4017–25. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/119/17/4017/1351265/zh801712004017.pdf>
303. Jia X, Zheng Y, Guo Y, Chen K. Sodium butyrate and panobinostat induce apoptosis of chronic myeloid leukemia cells via multiple pathways. *Mol Genet Genomic Med* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2020 Nov 25];7(5). Available from: </pmc/articles/PMC6503025/?report=abstract>
304. Yan-Fang T, Zhi-Heng L, Li-Xiao X, Fang F, Jun L, Gang L, et al. Molecular Mechanism of the Cell Death Induced by the Histone Deacetylase Pan Inhibitor LBH589 (Panobinostat) in Wilms Tumor Cells. Hsieh Y-H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2015 Jul 15 [cited 2020 Nov 25];10(7):e0126566. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0126566>
305. de la Rosa J, Urdiciain A, Aznar-Morales J, Melendez B, Rey J, Idoate M, et al. Panobinostat and its combination with 3-deazaneplanocin-a induce apoptosis and inhibit *In vitro* tumorigenesis and metastasis in GOS-3 glioblastoma cell lines. *Cancer Transl Med* [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 25];4(2):39. Available from: <http://www.cancertm.com/text.asp?2018/4/2/39/231376>
306. Grosej B, Kerr M, Kiltie AE. Radiosensitisation of bladder cancer cells by panobinostat is modulated by Ku80 expression. *Radiother Oncol* [Internet]. 2013 Sep [cited 2020 Nov 27];108(3):429–33. Available from: </pmc/articles/PMC3824066/?report=abstract>
307. Jeon YJ, Ko SM, Cho JH, Chae J Il, Shim JH. The HDAC inhibitor, panobinostat, induces apoptosis by suppressing the expression of specificity protein 1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Med* [Internet]. 2013 Oct [cited 2020 Nov 25];32(4):860–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23877235/>
308. Liu YL, Yang PM, Shun CT, Wu MS, Weng JR, Chen CC. Autophagy potentiates the anti-cancer effects of the histone deacetylase inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Autophagy* [Internet]. 2010 Nov 16 [cited 2020 Oct 31];6(8):1057–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20962572/>
309. Yang Y, Fiskus W, Yong B, Atadja P, Takahashi Y, Pandita TK, et al. Acetylated hsp70 and KAP1-mediated Vps34 SUMOylation is required for autophagosome creation in autophagy. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Apr 23 [cited 2020 Nov

- 14];110(17):6841–6. Available from:  
<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1217692110>
310. María Ovejero-Sánchez, Diego Iglesias-Corral, Rogelio González-Sarmiento ABH. Synergistic effect of Chloroquine and Panobinostat in ovarian cancer through induction of DNA damage and inhibition of DNA repair. *Oncogene*, sometido a publicación. 2021;
311. Hui B, Shi YH, Ding Z Bin, Zhou J, Gu CY, Peng YF, et al. Proteasome inhibitor interacts synergistically with autophagy inhibitor to suppress proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2012 Nov 15 [cited 2020 Nov 14];118(22):5560–71. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22517429/>
312. Ding Z Bin, Hui B, Shi YH, Zhou J, Peng YF, Gu CY, et al. Autophagy activation in hepatocellular carcinoma contributes to the tolerance of oxaliplatin via reactive oxygen species modulation. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Oct 1 [cited 2020 Nov 14];17(19):6229–38. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21825039/>
313. Liang X, Tang JC, Liang YL, Jin RA, Cai XJ. Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells. *Cell Biosci* [Internet]. 2014 Mar 3 [cited 2020 Nov 14];4(1):10. Available from: <http://cellandbioscience.biomedcentral.com/articles/10.1186/2045-3701-4-10>
314. Konsoula Z, Cao H, Velená A, Jung M. Adamantanyl-histone deacetylase inhibitor H6CAHA exhibits favorable pharmacokinetics and augments prostate cancer radiation sensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2020 Nov 21];79(5):1541–8. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21277099/>
315. Baschnagel A, Russo A, Burgan WE, Carter D, Beam K, Palmieri D, et al. Vorinostat enhances the radiosensitivity of a breast cancer brain metastatic cell line grown in vitro and as intracranial xenografts. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2009 Jun [cited 2020 Nov 21];8(6):1589–95. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19509253/>
316. Munshi A, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, Richon VM, Meyn RE. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of  $\gamma$ -H2AX foci. *Mol Cancer Ther*

- [Internet]. 2006 Aug [cited 2020 Nov 21];5(8):1967–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16928817/>
317. Munshi A, Kurland JF, Nishikawa T, Tanaka T, Hobbs ML, Tucker SL, et al. Histone deacetylase inhibitors radiosensitize human melanoma cells by suppressing DNA repair activity. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2020 Nov 21];11(13):4912–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16000590/>
318. Deorukhkar A, Shentu S, Park HC, Diagaradjane P, Puduvalli V, Aggarwal B, et al. Inhibition of radiation-induced DNA repair and prosurvival pathways contributes to vorinostat-mediated radiosensitization of pancreatic cancer cells. *Pancreas* [Internet]. 2010 Nov [cited 2020 Nov 21];39(8):1277–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20531243/>
319. Bar-Sela G, Jacobs KM, Gius D. Histone Deacetylase Inhibitor and Demethylating Agent Chromatin Compaction and the Radiation Response by Cancer Cells. *Cancer J* [Internet]. 2007 Jan [cited 2020 Nov 21];13(1):65–9. Available from: <http://journals.lww.com/00130404-200701000-00011>
320. Chinnaiyan P, Vallabhaneni G, Armstrong E, Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response by histone deacetylase inhibition. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2020 Nov 21];62(1):223–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15850925/>
321. Alvarez AA, Field M, Bushnev S, Longo MS, Sugaya K. The Effects of Histone Deacetylase Inhibitors on Glioblastoma-Derived Stem Cells. *J Mol Neurosci* [Internet]. 2014 [cited 2020 Nov 21];55(1):7–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24874578/>
322. Hehlhans S, Storch K, Lange I, Cordes N. The novel HDAC inhibitor NDACI054 sensitizes human cancer cells to radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2013 Oct 1;109(1):126–32.
323. de Andrade PV, Andrade AF, de Paula Queiroz RG, Scrideli CA, Tone LG, Valera ET. The histone deacetylase inhibitor PCI-24781 as a putative radiosensitizer in pediatric glioblastoma cell lines. *Cancer Cell Int* [Internet]. 2016 Apr 18 [cited 2020 Nov 27];16(1):31. Available from: </pmc/articles/PMC4835828/?report=abstract>
324. Palumbo S, Pirtoli L, Tini P, Cevenini G, Calderaro F, Toscano M, et al. Different involvement of autophagy in human malignant glioma cell lines undergoing

- irradiation and temozolomide combined treatments. *J Cell Biochem.* 2012 Jul;113(7):2308–18.
325. Greve G, Schiffmann I, Pfeifer D, Pantic M, Schüler J, Lübbert M. The pan-HDAC inhibitor panobinostat acts as a sensitizer for erlotinib activity in EGFR-mutated and -wildtype non-small cell lung cancer cells. *BMC Cancer* [Internet]. 2015 Dec 16 [cited 2020 Nov 21];15(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26675484/>
326. Chude CI, Amaravadi RK. Targeting autophagy in cancer: Update on clinical trials and novel inhibitors. Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2017.
327. Shi W, Palmer JD, Werner-Wasik M, Andrews DW, Evans JJ, Glass J, et al. Phase I trial of panobinostat and fractionated stereotactic re-irradiation therapy for recurrent high grade gliomas. *J Neurooncol* [Internet]. 2016 May 1 [cited 2020 Nov 21];127(3):535–9. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11060-016-2059-3>
328. Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR, Lamborn KR, Nudelman A, Rephaeli A, et al. In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas. *Neuro Oncol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2020 Nov 21];9(2):82–8. Available from: </pmc/articles/PMC1871664/?report=abstract>
329. Lee EQ, Reardon DA, Schiff D, Drappatz J, Muzikansky A, Grimm SA, et al. Phase II study of panobinostat in combination with bevacizumab for recurrent glioblastoma and anaplastic glioma. *Neuro Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2020 Nov 21];17(6):862–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25572329/>
330. Ghobrial IM, Campigotto F, Murphy TJ, Boswell EN, Banwait R, Azab F, et al. Results of a phase 2 trial of the single-agent histone deacetylase inhibitor panobinostat in patients with relapsed/refractory Waldenström macroglobulinemia. *Blood* [Internet]. 2013 Feb 21 [cited 2020 Nov 21];121(8):1296–303. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23287861/>
331. Blum KA, Advani A, Fernandez L, Van Der Jagt R, Brandwein J, Kambhampati S, et al. Phase II study of the histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in patients with previously treated chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* [Internet]. 2009 Nov [cited 2020 Nov 21];147(4):507–14. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19747365/>
332. Gryder BE, Sodji QH, Oyelere AK. Targeted cancer therapy: Giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed [Internet]. Vol. 4, Future Medicinal Chemistry. Future Med Chem; 2012 [cited 2020 Nov 21]. p. 505–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22416777/>
  333. O'Connor OA, Heaney ML, Schwartz L, Richardson S, Willim R, MacGregor-Cortelli B, et al. Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies. *J Clin Oncol* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2020 Nov 21];24(1):166–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16330674/>
  334. Briceño E, Reyes S, Sotelo J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurg Focus* [Internet]. 2003 [cited 2021 Feb 28];14(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15727424/>
  335. Briceño E, Calderon A, Sotelo J. Institutional experience with chloroquine as an adjuvant to the therapy for glioblastoma multiforme. *Surg Neurol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2021 Feb 28];67(4):388–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17350410/>
  336. Sotelo J, Briceño E, López-González MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* [Internet]. 2006 Mar 7 [cited 2021 Feb 28];144(5):337–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16520474/>
  337. Eldredge HB, DeNittis A, DuHadaway JB, Chernick M, Metz R, Prendergast GC. Concurrent whole brain radiotherapy and short-course chloroquine in patients with brain metastases: A pilot trial. *J Radiat Oncol* [Internet]. 2013 Aug 16 [cited 2021 Feb 28];2(3):315–21. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13566-013-0111-x>
  338. Rojas-Puentes LL, Gonzalez-Pinedo M, Crismatt A, Ortega-Gomez A, Gamboa-Vignolle C, Nuñez-Gomez R, et al. Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study of whole-brain irradiation with concomitant chloroquine for brain metastases. *Radiat Oncol* [Internet]. 2013 Sep 8 [cited 2021 Feb 28];8(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010771/>
  339. Levy JMM, Zahedi S, Griesinger AM, Morin A, Davies KD, Aisner DL, et al. Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF

- inhibition in brain tumors. *Elife*. 2017 Jan 17;6.
340. Levy JMM, Thompson JC, Griesinger AM, Amani V, Donson AM, Birks DK, et al. Autophagy inhibition improves chemosensitivity in BRAFV600E brain tumors. *Cancer Discov* [Internet]. 2014 [cited 2021 Feb 28];4(7):773–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24823863/>
  341. Stiborova M, Eckschlager T, Poljakova J, Hrabeta J, Adam V, Kizek R, et al. The Synergistic Effects of DNA-Targeted Chemotherapeutics and Histone Deacetylase Inhibitors As Therapeutic Strategies for Cancer Treatment. *Curr Med Chem* [Internet]. 2012 Sep 24 [cited 2021 Feb 28];19(25):4218–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22680633/>
  342. Bhaskara S. Histone deacetylases 1 and 2 regulate DNA replication and DNA repair: Potential targets for genome stability-mechanism-based therapeutics for a subset of cancers. *Cell Cycle* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2021 Feb 28];14(12):1779–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25942572/>
  343. Bilger A, Bittner MI, Grosu AL, Wiedenmann N, Meyer PT, Firat E, et al. FET-PET-basierte Rebestrahlung und Chloroquin bei Patienten mit rezidiviertem Glioblastom: Erste Ergebnisse zu Toleranz und Durchführbarkeit. *Strahlentherapie und Onkol* [Internet]. 2014 Sep 30 [cited 2021 Feb 28];190(10):957–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24928248/>

