



**UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR**

**IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE RESPUESTA Y  
PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN LA RESISTENCIA AL  
TRATAMIENTO CON SELUMETINIB (AZD6244) EN LINEAS  
CELULARES DE CARCINOMA COLORRECTAL**

**Silvina Grasso Cicala**

**Tesis Doctoral**

**2014**

La doctora **M<sup>a</sup> Isabel Martínez-Lacaci Fortuny**, Investigadora responsable de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca y profesora asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche y el doctor **José Antonio Ferragut Rodríguez**, Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

HACEN CONSTAR que el presente trabajo de investigación ha sido realizado bajo su dirección por **Silvina Grasso Cicala** con la finalidad de obtener el grado de Doctor. La mayor parte de este trabajo se ha desarrollado en el Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche, con la excepción de las investigaciones en autofagia, las cuales se han llevado a cabo en el Instituto de Farmacología de la Universidad Federal de Sao Paulo, Brasil, gracias a un traslado temporal otorgado a la estudiante por el Ministerio de Educación dentro del programa de becas F.P.U. (Formación de Profesorado Universitario).

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche, a 10 de enero de 2014.

Los Directores de la Tesis:

**Fdo: Dra. M<sup>a</sup> Isabel Martínez-Lacaci Fortuny**

**Fdo: Dr. José Antonio Ferragut Rodríguez**



**Antonio Ferrer Montiel**, director del Instituto de Biología Molecular y Celular (IBMC) de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

**da su conformidad** a la lectura de la Tesis Doctoral titulada “Identificación de marcadores de respuesta y papel de la autofagia en la resistencia al tratamiento con Selumetinib (AZD6244) en líneas celulares de carcinoma colorrectal”, presentada por doña **Silvina Grasso Cicala**.

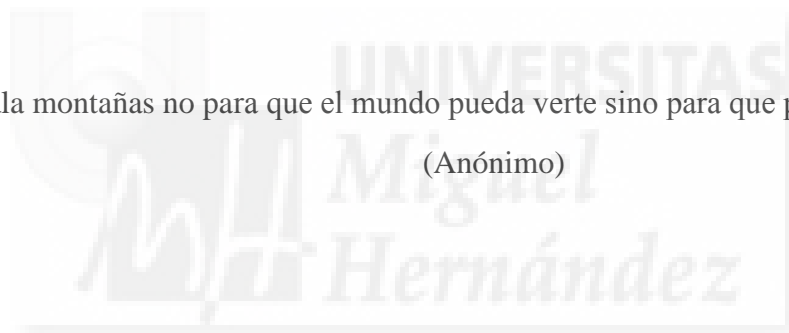
Para que conste y surta los efectos oportunos, firma el presente certificado, en Elche, a 10 de enero de 2014.

El Director del Instituto de Biología Molecular y Celular:

**Fdo.: Prof. Antonio Ferrer Montiel**

“Escala montañas no para que el mundo pueda verte sino para que puedas ver el mundo”

(Anónimo)



## AGRADECIMIENTOS

*Llegué a España en el año 2006 con la ilusión de comenzar una nueva vida en este país del que tanta gente me había hablado...con miedos, ilusiones, proyectos y tantas otras cosas más...Tuve la gran suerte de dar con una gran persona, el Dr. Jose Antonio Ferragut (familiarmente Pepe para mí), quien me abrió desde el primer día las puertas para dar comienzo a esta gran aventura que hoy, luego de tanto esfuerzo culmina con este trabajo. Por ello, no tengo más que palabras de agradecimiento para esta persona y tantas otras que formaron parte de esta aventura.*

*Pepe, gracias por permitirme ser parte de tu equipo, por apoyarme cuando te he pedido apoyo y por apoyarme sin pedirte apoyo. Gracias por los ánimos cuando más los necesitaba y sobre todo, gracias por haber confiado en mí.*

*Isabel, gracias por haberme enseñado tantas cosas durante todo este tiempo, por haber tenido paciencia conmigo y por haber compartido tantas “charlas científicas”. Gracias por tu apoyo y por siempre estar dispuesta a ayudarme, gracias.*

*El 1.5 no solo fue mi lugar de trabajo durante estos años sino un lugar donde conocí gente fabulosa y que hoy me llevo como amigos. Lourdes, gracias por escucharme y por tener siempre una palabra de aliento para mí, esas cosas no se olvidan...Estefa, gracias y más gracias por las mil y mil y una vez que entraba a tu cuartito a preguntarte cosas, “Estefaaaaa...”y siempre estabas ahí con una sonrisa, gracias por tu amistad. Angeles, gracias por darle esa alegría al laboratorio con tus típicas carcajadas. Las “murcians”, Pilar, Mariano, Fernando, Charo, Patri, gracias por haber compartido tantas cosas conmigo durante este tiempo, cada uno aportando su granito de arena. Miguel, gracias por haberme enseñado tantas cosas y por haber compartido esas charlas enriquecedoras conmigo, de las que he aprendido un montón.*

*Muchísimas gracias a la gente de la secretaría, May, Javier, Carmen y Raquel, que siempre me recibían con una sonrisa y me ayudaban en todo, con simpatía, eficiencia y amabilidad. May gracias por todo el tiempo que has dedicado en mí en esta última fase burocrática, “lo resuelves todo”!!!*

*Gracias a mis amigos de la vida, algunos lejos otros no tanto, Lauri, Majo, Maca, Sole, Vero, Norma, Choncho, por cada uno aportarme algo diferente y por haber compartido sus vidas conmigo. A mi primo Gonza por escucharme siempre y aconsejarme...*

*Gracias a mi "familia" de España, Esteban, Estebitan, Renee, Serrana, Mercedes, gracias por ayudarnos tanto y hacernos sentir tan cerca.*

*Gracias a mi familia, que aunque esté lejos está cerca...*

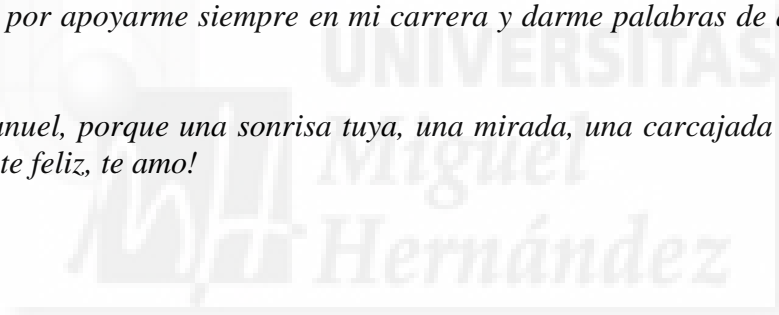
*A mi madre por educarnos en el esfuerzo y prepararnos tan bien para la vida, gracias mamá!*

*A mi padre, por apoyarme siempre en todo momento y tener esa visión tan positiva de la vida, de la que intento aprender todos los días...*

*A Ser y a mis hermanos, Juan, Ale, Leo y Magui por haber compartido tantas cosas lindas juntos, por estar siempre conmigo y por quererme tanto...*

*A Nico, porque formaste parte de mi vida ya hace dieciseis años y por haber compartido tantas cosas juntos, por apoyarme siempre en mi carrera y darme palabras de aliento cuando más las precisaba...*

*A mi hijo Manuel, porque una sonrisa tuya, una mirada, una carcajada ya me bastan para ser completamente feliz, te amo!*



## INDICE

INDICE DE FIGURAS .....	1
INDICE DE TABLAS .....	3
RESUMEN .....	7
PREFACIO .....	9
INTRODUCCIÓN I .....	10
Incidencia del cáncer colorrectal .....	11
Anatomía del colon y recto.....	12
Tipos de tumores intestinales .....	14
Bases moleculares del CCR.....	15
CCR hereditario.....	19
Patrón de metástasis del CCR.....	21
Métodos de detección de CCR .....	21
Estadificación del cáncer colorrectal.....	23
Fases del cáncer del colorrectal .....	24
Elección del tipo de tratamiento para un paciente con CCR .....	26
Terapia citotóxica y terapia dirigida.....	27
Tipos de tratamiento en cáncer de recto .....	28
Tipos de tratamiento en cáncer de colon .....	28
INTRODUCCIÓN II .....	35
Moléculas diana de la terapia dirigida: Vías PI3K y RAF/MEK/ERK.....	36
<i>Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/p70S6K.....</i>	<i>36</i>
<i>Vía de señalización RAF/MEK/ERK .....</i>	<i>45</i>
Entrecruzamiento entre las vías PI3K y RAF/MEK/ERK.....	48
Razones para inhibir las vías PI3K y RAF/MEK/ERK.....	48
Efectos tóxicos de los agentes “dirigidos” a las vías PI3K y RAF/MEK/ERK .....	48
Necesidad de biomarcadores en el desarrollo de los agentes quimioterapéuticos .....	49

AZD6244 como nueva terapia dirigida en CCR .....	51
INTRODUCCIÓN III.....	53
Muerte celular por apoptosis .....	54
El proceso de autofagia.....	55
i)    Autofagia y cáncer .....	57
ii)   Papel de la autofagia en supervivencia tumoral .....	59
iii)  Papel dual de la autofagia en respuesta a agentes quimioterapéuticos .....	60
iv)   Inhibidores de la autofagia .....	61
v)   Métodos de detección de autofagia .....	62
OBJETIVOS.....	65
MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
Líneas celulares .....	69
Reactivos .....	69
Ensayo de proliferación celular MTT.....	69
Ensayo de formación de colonias en agar blando.....	70
Estudio de las fases del ciclo celular .....	71
Obtención de extractos de proteína .....	72
Método de Bradford .....	73
Análisis de proteínas por Western Blot .....	73
Densitometrías .....	78
Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Acidos (O.V.A.s).....	79
Transfección transitoria con GFP-LC3 .....	80
Estudio de la viabilidad celular mediante AnexinaV-IP .....	81
Estadística.....	84
RESULTADOS I.....	85
1)    Efecto de AZD sobre la proliferación celular .....	86
2)    Efecto de AZD sobre la formación de colonias en agar blando .....	87



3)	Efecto de AZD sobre el ciclo celular .....	88
4)	Asociación entre los niveles basales de fosfo-ERK1/2 y resistencia a AZD.....	91
5)	Relación entre el grado de inhibición de ERK1/2 y la resistencia a AZD.....	92
7)	Efecto de AZD sobre la fosforilación de AKT, p70S6K y RPS6.....	95
8)	Las líneas celulares resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 presentan niveles basales elevados de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6 .....	98
9)	Reversión de la resistencia en HGUE-C-1, DLD-1 y HCT-15 por inhibición de p70S6K y RPS6.....	99
a)	Reversión de la resistencia por inhibición con BEZ .....	100
b)	Reversión de resistencia por inhibición con PF-4708671 .....	104
RESULTADOS II .....		106
1)	Efecto de AZD sobre la muerte celular .....	108
a)	Efecto de AZD sobre la muerte celular en la línea celular resistente HGUE-C-1 ...	108
b)	Efecto de AZD sobre la muerte celular en la línea celular sensible SW480.....	109
2)	Efecto de AZD sobre la autofagia.....	111
a)	Efecto de AZD sobre la autofagia en la línea resistente HGUE-C-1 .....	111
b)	Efecto de AZD sobre la autofagia en la línea celular sensible SW480.....	114
3)	Efecto de la inhibición de autofagia sobre la muerte inducida por AZD en SW480....	120
a)	Inhibición de autofagia por Bafilomicina A1, Cloroquina y 3-Metiladenina .....	121
c)	Efecto de BAF sobre la muerte celular inducida por AZD .....	125
d)	Efecto de CQ sobre la muerte celular inducida por AZD .....	126
e)	Efecto de 3-MA sobre la muerte celular inducida por AZD .....	127
4)	Efecto de la inducción de autofagia sobre la muerte inducida por AZD .....	128
DISCUSIÓN I .....		130
DISCUSIÓN II .....		144
CONCLUSIONES.....		155
ANEXO .....		161



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia de los distintos tipos de tumores previstos para el año 2015 en España .....	12
Figura 2: Anatomía del colon y recto .....	13
Figura 3: Estructura del epitelio intestinal.....	13
Figura 4: Vía de la PI3K.....	37
Figura 5: Vía RAF/MEK/ERK.....	46
Figura 6: Tipos de autofagia.....	56
Figura 7: Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante citometría de flujo. ....	71
Figura 8: Desnaturalización de proteínas mediante SDS .....	74
Figura 9: Sistema de electroforesis de proteínas de Bio-Rad.....	75
Figura 10: Sándwich de transferencia. ....	75
Figura 11: Reacción quimioluminiscente.....	77
Figura 12: Unión de AnexinaV-FITC al fosfolípido de membrana fosfatidilserina (FS) .....	81
Figura 13: Efecto de AZD sobre la muerte celular utilizando el kit de de AnexinaV-FITC y IP. ....	82
Figura 14: Efecto de AZD sobre la proliferación celular .....	86
Figura 15: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular .....	91
Figura 16: Estado de fosforilación basal de la quinasa ERK1/2 .....	92
Figura 17: Efecto de AZD sobre la fosforilación de ERK1/2. ....	93
Figura 18: Efecto de AZD sobre la fosforilación de AKT .....	95
Figura 19: Efecto de AZD sobre la fosforilación de S6K1 y RPS6. ....	97
Figura 20: Estado de fosforilación basal de p70S6K y RPS6. ....	99
Figura 21: Estructura química de los compuestos NVP-BEZ235 y PF-4708671. ....	100
Figura 22: Efecto de AZD+BEZ (MTT) en líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1 ..	102
Figura 23: Efecto de AZD+BEZ (ciclo celular) en líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1.....	103
Figura 24: Efecto de AZD+PF en líneas celulares resistentes HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1. ....	105
Figura 25: Efecto de AZD sobre proliferación y muerte en línea celular HGUE-C-1 .....	109
Figura 26: Efecto de AZD sobre proliferación y muerte en línea celular SW480. ....	110
Figura 27: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre niveles de LC3-II y p62 en línea celular HGUE-C-1..	112
Figura 28: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre formación de O.V.A.s en línea celular HGUE-C-1. ...	113
Figura 29: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre la distribución de GFP-LC3 en línea celular HGUE-C-1 .....	114
Figura 30: Efecto de AZD 1 $\mu$ M sobre niveles de LC3-II y p62 en la línea celular SW480. ....	115

Figura 31: Efecto de AZD 1 $\mu$ M sobre la formación de O.V.A.s en la línea celular SW480.....	116
Figura 32: Efecto de AZD 1 $\mu$ M sobre la distribución de GFP-LC3 en la línea celular SW480.....	117
Figura 33: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre niveles de Atg5-Atg12, p62, Beclina y LC3-II en la línea celular SW480 .....	118
Figura 34: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre la formación de O.V.A.s en línea celular SW480.....	119
Figura 35: Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre la distribución de GFP-LC3 en línea celular SW480..	120
Figura 36: Inhibidores clásicos de autofagia .....	121
Figura 37: Inhibición de autofagia por BAF, CQ y 3-MA en la línea celular sensible SW480..	124
Figura 38: Efecto de BAF sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480.....	126
Figura 39: Efecto de CQ sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480 .....	127
Figura 40: Efecto de 3-MA sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480.....	128
Figura 41: Efecto de RAPA sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480.....	129
Figura 42: Niveles de expresión de la proteína Retinoblastoma (Rb) en las líneas celulares sensibles y resistentes a AZD .....	162
Figura 43: Efecto de BEZ235 (BEZ) sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular.....	162
Figura 44: Efecto de BAF, CQ, 3-MA y RAPA sobre la proliferación celular en la línea celular SW480.....	163

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Sistema de clasificación TNM .....	25
Tabla 2: Sistema de clasificación TNM .....	26
Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western Blot.....	77
Tabla 4: Valores de IC <sub>50</sub> e inhibición de la proliferación celular por AZD .....	87
Tabla 5: Efecto de AZD sobre la formación de colonias .....	88
Tabla 6: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular.....	89
Tabla 7: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular.....	90
Tabla 8: Estado mutacional de los genes <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> y <i>PIK3CA</i> .....	95



## INDICE DE ABREVIATURAS

**ACE:** Antígeno Carcino-Embrionario

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AJCC:** *American Joint Committee in Cancer*. Comité de Unión Americana en Cáncer

**ATCC:** *American Type Culture Collection*. Colección Americana de cultivos

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BSA:** *Bovine serum albumin*. Albúmina de suero bovino

**CCR:** Cáncer colorrectal

**CCRM:** Cáncer colorrectal metastásico

**CTX:** Cetuximab

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Medio Eagle modificado por Dulbecco

**ECL:** *Enhanced Chemical Luminiscence*. Luminiscencia química potenciada

**EEM.:** Error estándar de la media

**EGF:** *Epidermal Growth Factor*. Factor de crecimiento epidérmico

**EGFR:** *Epidermal Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

**eIF2:** *Eukaryotic Initiation Factor 2 alpha*. Factor 2 eucariótico de iniciación de la traducción

**ERK:** *Extracellular signal-Regulated Kinase*. Quinasa regulada por señales extracelulares

**FDA:** *Food and Drug Administration*. Administración de alimentos y fármacos

**FITC:** *Fluorescein Isothiocyanate*. Isotioisocianato de fluoresceína

**FOLFIRI:** irinotecan/5-fluorouracilo/leucovorina

**FOLFOX:** 5-FU/leucovorina/oxaliplatino

**5-FU:** 5-fluoracilo

**5-FU/LV:** 5-FU/leucovorina

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*. Proteína fluorescente verde

**GIST:** *Gastrointestinal Stromal Tumor*. Tumor de estroma gastrointestinal

**HGUE:** Hospital General Universitario de Elche

**IARC:** *International Agency for Research on Cancer*. Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer

**IP:** Ioduro de propidio

**IUAC:** *International Union Against Cancer*. Unión Internacional contra el cáncer

**IC<sub>50</sub>:** *Inhibitory concentration 50*. Concentración inhibitoria 50

**IFL:** irinotecan/5-FU/leucovorina

**IGF:** *Insulin-like Growth Factor*. Factor de crecimiento insulínico

**INC:** Instituto Nacional de Cáncer

**IRM:** Imagen por resonancia magnética

**MOSAIC:** *Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/ Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer*

**mTOR:** *mammalian Target Of Rapamycin*. Diana de rapamicina en mamíferos

**MTT:** Bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio

**NSABP:** *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*. Proyecto Nacional Quirúrgico Adjuvante en mama e intestino

**OS:** *Overall survival*. Supervivencia libre de enfermedad

**OXA:** Oxaliplatino

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*. Tampón fosfato salino

**PDGF:** *Platelet-Derived Growth Factor*. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PDGFR:** *Platelet-Derived Growth Factor Receptor*. Receptor de factores de crecimiento derivados de plaquetas

**PH:** *Pleckstrin homology*. Homólogo de plecstrina

**PI3-K:** *Phosphoinositide 3-kinase*. Fosfatidilinositol 3-quinasa

**PI:** *Phosphatidylinositol*. Fosfatidilinositol

**PIP:** *Phosphatidylinositol monophosphate*. Fosfatidilinositol monofosfato

**PIP<sub>2</sub>:** *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato

**PIP<sub>3</sub>:** *Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*. Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato

**PKB:** *Protein kinase B*. Proteína quinasa B (también AKT)

**PTEN:** *Phosphatase and tensin homolog*. Homólogo de fosfatasa y tensina

**RE:** Retículo endoplásmico

**RTQ:** Receptor tirosina quinasa

**Rb:** Retinoblastoma

**RPS6:** *Ribosomal Protein S6*. Proteína ribosomal S6

**SBF:** Suero bovino fetal

**SDS:** *SodiumDodecilSulphate*. Dodecilsulfato sódico

**SDS-PAGE:** *Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

**SF:** Sigmoidoscopia flexible

**SG:** Supervivencia global

**SLE:** Supervivencia libre de enfermedad

**SLP:** Supervivencia libre de progresión

**S6K1:** *S6 kinase 1*, S6 quinasa 1

**TAC:** Tomografía Axial Computarizada

**TEP:** Exploración con Tomografía por Emisión de Positrones

**TSC1:** *Tuberous Sclerosis Complex1*

**TSC2:** *Tuberous Sclerosis Complex2*

**VEGF:** *Vascular Endothelial Growth Factor*. Factor de crecimiento endotelial vascular

**VEGFR:** *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*. Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

**XELOX:** capecitabina/oxaliplatino





## RESUMEN

AZD6244 (Selumetinib, ARRY-142886) es un inhibidor de MEK1/2 que ha ganado interés en los últimos tiempos como agente antitumoral. Los principales objetivos de este trabajo de tesis doctoral han consistido en la identificación de marcadores de respuesta y en la evaluación del papel de la autofagia en la resistencia al tratamiento con AZD6244.

A través de ensayos de proliferación, hemos clasificado las diferentes líneas celulares en sensibles y resistentes en función de sus valores de  $IC_{50}$ . De forma interesante, AZD6244 es capaz de inhibir la fosforilación de p70S6K y de su proteína diana efectora, RPS6, en las líneas celulares sensibles. Sin embargo, en las células resistentes, los niveles de fosforilación de estas proteínas permanecen inalterados o incluso aumentan en respuesta al tratamiento con AZD6244. Además, las células resistentes presentan niveles basales de fosforilación de p70S6K y RPS6 muy elevados, comparado con las células sensibles en las que los niveles basales de fosforilación de estas proteínas son mínimos. La inhibición farmacológica de p70S6K y RPS6 utilizando NVP-BEZ235 (un inhibidor dual de PI3K y mTOR) y PF-4708671 (un inhibidor específico de p70S6K) potencia el efecto de AZD6244 en las células resistentes. Como conclusión, p70S6K y su diana efectora RPS6 podrían actuar como biomarcadores de respuesta potenciales de la resistencia a AZD6244 en cáncer colorrectal.

La segunda parte de este trabajo ha tenido como objetivo examinar el papel de la autofagia en la capacidad de AZD6244 para inducir muerte celular. Con esta finalidad, hemos empleado moduladores de autofagia tales como Bafilomicina A1 (BAF), Cloroquina (CQ), 3-Metiladenina (3-MA) y Rapamicina (RAPA). Curiosamente, AZD6244 induce muerte celular acompañada de autofagia en las células sensibles a AZD6244. Además, los inhibidores autofágicos BAF, 3-MA y CQ potencian la muerte celular inducida por AZD6244. Sin embargo, cuando AZD6244 es utilizado en combinación con el inductor autofágico RAPA, se observa una mayor supervivencia de las células. En el caso de las células resistentes, la autofagia no parece desempeñar un papel en su resistencia. En conjunto, estos resultados sugieren que la autofagia estaría actuando como mecanismo protector en las células sensibles a AZD6244, con lo cual la combinación de inhibidores de autofagia con AZD6244 podría constituir una estrategia terapéutica interesante en los tratamientos de los pacientes con cáncer de colon y recto.

## ABSTRACT

AZD6244 (Selumetinib, ARRY-142886) is a MEK1/2 inhibitor that has gained interest as an anti-tumour agent. The main aims of this doctoral study were to identify response markers and to evaluate the role of autophagy in mediating resistance to AZD6244.

By using proliferation assays, we have classified the cells in AZD6244-sensitive and AZD6244-resistant according to their  $IC_{50}$  value. Interestingly, AZD6244 inhibits phosphorylation of p70S6K and its main target, RPS6 in sensitive cell lines, whereas in resistant cells p70S6K and RPS6 phosphorylation is unaffected or even increase. Also, AZD6244-resistant cells show increased basal levels of p70S6K phosphorylation, whereas phosphorylation basal levels of this protein are minimal in AZD6244-sensitive cells. In fact, pharmacological inhibition of p70S6K and RPS6 by NVP-BEZ235 (a dual inhibitor of PI3K and mTOR) or PF-4708671 (a specific p70S6K inhibitor) potentiate AZD6244 effects in resistant cell lines. In conclusion, p70S6K and its main target RPS6 could act as potential biomarkers of response to AZD6244 treatment in colorectal cancer.

The second part of this study aimed to examine the role of autophagy in the ability of AZD6244 to induce cell death. For this purpose, autophagy modulators such as Bafilomycin A1 (BAF), Chloroquine (CQ), 3-Metiladenine (3-MA) and Rapamycin (RAPA) have been used. Interestingly, AZD6244 induces both cell death and autophagy in AZD6244-sensitive cells. Moreover, BAF, 3-MA and CQ potentiate AZD6244-induced cell death. However, when AZD6244 is combined with the autophagy inducer, RAPA, an increase in cell survival is observed. In contrast, autophagy does not seem to have a role in mediating resistance in AZD6244-resistant cells. Altogether, these results suggest that autophagy could act as a survival mechanism in cell lines sensitive to AZD6244. Thus, autophagy inhibitors in combination with AZD6244 may be an interesting therapeutic strategy to treat colorectal cancer.

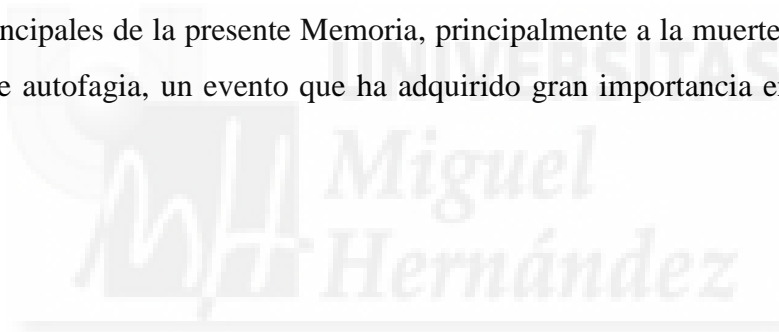
## **PREFACIO**

La introducción de este trabajo de tesis está dividida en tres secciones:

La **primera parte** consiste en una introducción general al tema y hace referencia a la importancia del cáncer colorrectal, métodos de detección, sus bases moleculares, clasificación de los tumores colorrectales y los tratamientos actuales.

La **segunda parte** contempla el estudio del primer objetivo principal e incluye una descripción detallada de las vías de señalización PI3K y RAF/MEK/ERK y sus mutaciones, las cuales desempeñan un papel crítico en cáncer. También en esta sección se analiza la importancia de la identificación de marcadores de respuesta eficaces al tratamiento del cáncer de colon.

La **tercera parte** de la introducción se refiere a estudios relacionados con el segundo de los objetivos principales de la presente Memoria, principalmente a la muerte celular por apoptosis y al proceso de autofagia, un evento que ha adquirido gran importancia en cáncer en los últimos años.



# **INTRODUCCIÓN I**



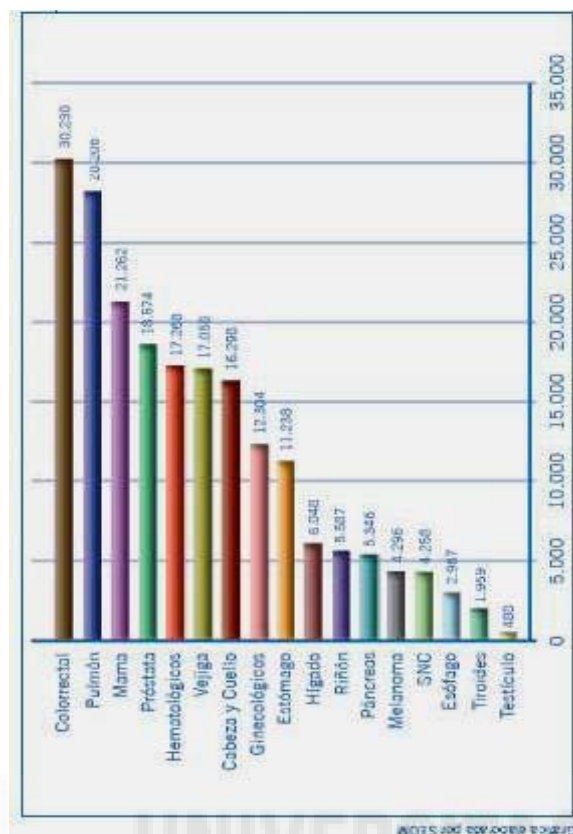
## **Incidencia del cáncer colorrectal**

El cáncer representa un problema de salud pública de gran importancia en el mundo. Según datos extraídos del último informe Globocan elaborado por la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (*IARC, International Agency for Research on Cancer*), en el año 2008 se diagnosticaron aproximadamente 12,7 millones de nuevos casos de cáncer y alrededor de 7,6 millones de muertes a nivel mundial (Jemal et al., 2011; Ferlay et al., 2010b).

El cáncer colorrectal (CCR) incluye cualquier tipo de neoplasias del colon, recto y apéndice. El CCR es el tercer tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado a nivel mundial detrás del cáncer de pulmón (1,61 millones) y del cáncer de mama (1,38 millones), con 1,23 millones de nuevos casos al año. Asimismo, el CCR es la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo, muriendo cada año aproximadamente 608,000 personas a causa de esta enfermedad (Ferlay et al., 2010a).

España, históricamente se consideraba una población de bajo riesgo. Sin embargo, en los últimos años la incidencia de CCR en este país ha aumentado considerablemente. Según el último informe Globocan, si se toman en cuenta hombres y mujeres, el CCR es el primer tumor maligno en incidencia y el segundo en mortalidad. Cada año se diagnostican más de 25,000 nuevos casos, de los cuales aproximadamente el 56% acaba en fallecimiento. Esto se traduce en 500 nuevos casos semanalmente y una mortalidad de 250 personas cada semana (Jemal et al., 2011; Ferlay et al., 2010b).

A continuación detallamos los datos de la incidencia anual de cáncer para la población española previstos para el año 2015. Como se observa en el gráfico (Figura 1), el CCR continuará siendo el tipo de tumor más frecuente, por delante, en términos globales, del cáncer de pulmón y cáncer de mama (información extraída de la fuente <http://www.seom.org>).



**Figura 1: Incidencia de los distintos tipos de tumores previstos para el año 2015 en España**

Estos datos estadísticos tan desfavorables se deben en parte al desconocimiento sobre la enfermedad y a la escasa implantación de programas preventivos de detección precoz. Si el CCR es detectado precozmente se puede curar en más del 90% de los casos, con lo cual son muy importantes las campañas informativas de concienciación, explicando la relevancia de este tumor maligno y la posibilidad de ser detectado en sus fases más tempranas de desarrollo.

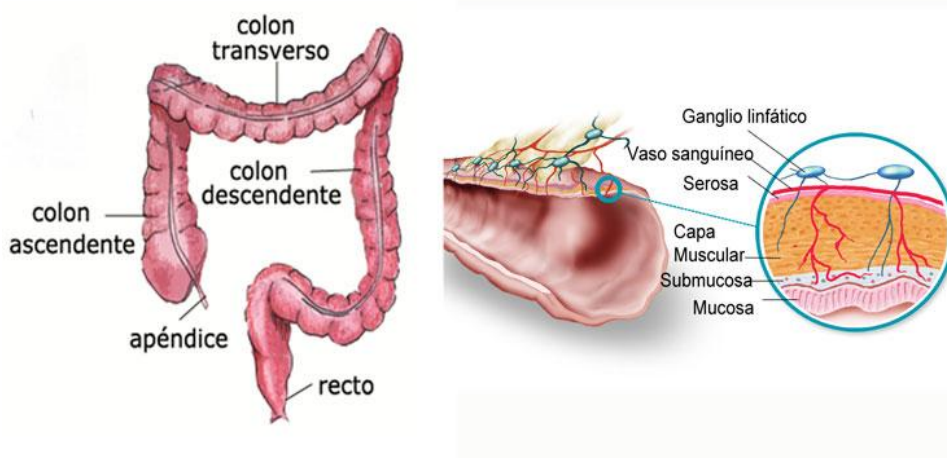
### **Anatomía del colon y recto**

La primera porción del colon o intestino grueso está situada en la parte inferior derecha del abdomen, es donde desemboca el intestino delgado y se llama ciego (Figura 2). Desde aquí el colon asciende hasta llegar a la zona del hígado (colon ascendente) y atraviesa el abdomen (colon transversal). El colon se dirige posteriormente hacia abajo, denominándose colon descendente, hasta llegar a una zona denominada sigma que desemboca en el recto. El recto (del latín *rectum*) es el último tramo del tubo digestivo, situado inmediatamente después del colon sigmoide. El recto recibe los materiales de desecho que quedan después del proceso de digestión de los alimentos, constituyendo las heces. Tiene una longitud de 15 cm, y de aquí las heces fecales salen del cuerpo a través del ano que se abre al exterior por el esfínter anal.



**Figura 2: Anatomía del colon y recto** (extraído de [www.aecc.es](http://www.aecc.es)).

La función específica del colon ascendente y transversal consiste en absorber agua y electrolitos (sodio, potasio, etc.), mientras que la función del colon descendente y recto consiste en almacenar las materias fecales hasta su expulsión por el ano. Tanto el colon como el recto están constituidos por varias capas de tejido; la más interna es la mucosa, que se encuentra rodeada por la submucosa. Más externamente se sitúa la capa muscular (su contracción logra el avance del contenido del tubo digestivo), que a su vez está recubierta por la serosa (capa más externa) (Figura 3). La mucosa está formada por un epitelio simple cilíndrico que forma numerosas glándulas mucosas tubulares denominadas criptas de Lieberkühn, las cuales secretan una gran cantidad de moco que favorece el tránsito de los desechos semisólidos no digeridos. Sobre estas glándulas productoras de moco se producen con mayor frecuencia los tumores de colon (información extraída de [www.aecc.es](http://www.aecc.es)).



**Figura 3: Estructura del epitelio intestinal** (extraído de [www.aecc.es](http://www.aecc.es)).

## Tipos de tumores intestinales

La gran mayoría de los CCR se desarrollan sobre lesiones ya existentes en la mucosa, como son los pólipos o enfermedades inflamatorias. El cáncer que aparece en una mucosa sana es excepcional. Existen varios tipos de tumores intestinales:

El **adenocarcinoma** es el tipo de cáncer más frecuente y aparece en el 90-95% de los casos de CCR. Su nombre proviene de las palabras “adeno” que significa “glándula” y “carcinoma”, que hace referencia a los tumores malignos que se originan a partir de células epiteliales, como la mucosa colorrectal. En resumen, un adenocarcinoma es un tipo de tumor maligno que se desarrolla en el tejido epitelial, específicamente en glándulas. Los adenocarcinomas de colon incluyen algunos tipos de cáncer de colon hereditario como el síndrome de Poliposis Adenomatosa Familiar y el síndrome de Lynch, entre otros (ver “CCR hereditario”).

El **tumor estromal gastrointestinal** (*GastroIntestinal Stromal Tumor, GIST*) es un tipo de sarcoma que se origina en la capa muscular que recubre el estómago y los intestinos (Lamba et al., 2012).

El **tumor carcinoide gastrointestinal** se forma a partir de células neuroendocrinas localizadas en el tubo gastrointestinal, las cuales elaboran hormonas que ayudan a controlar los jugos digestivos. La mayoría se presentan en el apéndice, el intestino delgado y el recto (Sun and Jung, 2004).

El **linfoma gastrointestinal** consiste en un tumor de estirpe linfoide extraganglionar cuya afectación exclusiva o primaria radica en el intestino (Solidoro et al., 1981).

El **melanoma gastrointestinal** es poco frecuente, ya que la mayoría de los melanomas detectados en el tracto digestivo tienen un origen metastásico. Hasta el año 2011 se han documentado sólo 12 casos de melanoma primario de colon (Khalid et al., 2011). Es un tumor extraordinariamente raro debido a que la presencia de melanoblastos es un evento muy poco frecuente a nivel de este segmento del tubo digestivo (Poggi et al., 2000; Woodruff, 1976).



## Bases moleculares del CCR

El CCR es una enfermedad heterogénea. Existen al menos tres vías moleculares que conducen al desarrollo de CCR: la vía de inestabilidad cromosómica, la vía de inestabilidad de microsatélites y la vía del fenotipo metilador de islas CpG. Describiremos brevemente cada una de ellas:

### i) Vía de inestabilidad cromosómica

Aproximadamente el 80-85% de los casos de CCR se desarrollan mediante la vía de inestabilidad cromosómica (*Chromosomal INstability, CIN*) (Grady, 2004). Los tumores que se originan a través de esta ruta se caracterizan por desarrollar una lesión microscópica inicial en la mucosa que precede a la formación de un pólipo, que se ha denominado “foco de cripta aberrante” (*Aberrant Crypt Focus, ACF*) (Takayama et al., 2001).

Los estudios pioneros sobre esta vía de carcinogénesis fueron llevados a cabo por Vogelstein y colaboradores en la década de los años 90 (Nowell, 1976; Nowell, 1976; Fearon and Vogelstein, 1990), quienes observaron que los tumores evolucionan de lesiones benignas a malignas mediante la adquisición una serie de mutaciones en el tiempo. Dichas mutaciones consisten en aberraciones cromosómicas tanto estructurales como numéricas (aneuploidía) (Rajagopalan and Lengauer, 2004).

La primera mutación que ocurre se denomina mutación “guardiana” (del inglés “*gatekeeping*”) y proporciona una ventaja selectiva de crecimiento a la célula epitelial normal, con lo cual ésta es capaz de crecer más rápidamente que las demás y convertirse en un clon microscópico. En el colon, las mutaciones “guardianas” generalmente ocurren en el gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) (Kinzler and Vogelstein, 1997). A partir de esta mutación se genera un pequeño adenoma que crece lentamente. Sin embargo, la mutación en un segundo gen, *KRAS* (*Kirsten RAt Sarcoma viral oncogene homolog*) dispara un segundo ciclo de crecimiento clonal, lo que permite un aumento mayor en el número de células (Fearon and Vogelstein, 1990). Las células que presentan solo la mutación *APC* pueden tener capacidad para sobrevivir, pero el número de células será menor comparado con las células que tienen mutados ambos genes. El proceso de mutación seguido por la expansión clonal continúa con mutaciones en genes como *SMAD2* (*Mothers Against Decapentaplegic homolog2*), *SMAD4* (*Mothers*

*Against Decapentaplegic homolog4*), **DCC** (*Deleted Colon Cancer*), **TP53** (*Tumor Protein 53*) y **PIK3CA** (*PhosphoInositide-3-Kinase, Catalytic, Alpha polypeptide*) generando finalmente un tumor maligno capaz de invadir la membrana basal y hacer metástasis en ganglios linfáticos y otros órganos (Jones et al., 2008). Las mutaciones que confieren una ventaja selectiva de crecimiento reciben el nombre de mutaciones “conductoras” (del inglés “*driver mutation*”).

En la época en que se propuso este interesante modelo de progresión tumoral, no se conocían con exactitud la función de la mayoría de los genes identificados. Sin embargo, el avance en los conocimientos permitió comprender mejor el papel de cada uno de ellos en la carcinogénesis. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos:

La primera anomalía genética que ocurre en el transcurso de esta ruta es una mutación en el gen **APC** y/o la pérdida del cromosoma 5q que contiene el gen **APC**. Estas anomalías genéticas conducen a la formación de una proteína APC truncada incapaz de unirse a  $\beta$ -catenina. La unión de la proteína APC a  $\beta$ -catenina colabora en la inactivación de la vía Wnt (*Wingless-type*), que regula procesos como crecimiento, apoptosis, diferenciación y motilidad celular (Cadigan and Liu, 2006). Las mutaciones en el gen **APC** pueden ocurrir en la línea germinal o en las células somáticas. Las mutaciones germinales dan lugar al síndrome de adenomatosis familiar, una enfermedad hereditaria que tiene como consecuencia una mayor tendencia a contraer cáncer de colon (ver sección “CCR hereditario”). Por su parte, las mutaciones somáticas en este gen están presentes en la mayoría de los adenomas colorrectales esporádicos y carcinoma colorrectal. El 80% de los adenomas que se producen tempranamente en el desarrollo de CCR contienen una mutación en el gen **APC** (Goss and Groden, 2000).

El segundo evento mutacional que ocurre en el transcurso de esta ruta consiste en una mutación en el gen **KRAS**. La proteína KRAS es una proteína de unión a GTP que forma parte de la vía RAF/MEK/ERK (ver “Vía de señalización RAF/MEK/ERK”). La mutación en este gen produce una pérdida de la actividad GTPasa de la proteína y como resultado la ruta RAF/MEK/ERK es activada constitutivamente. Aproximadamente un 35% de los adenomas avanzados y los tumores de CCR presentan esta mutación (Leslie et al., 2002; Cheng and Lai, 2003).

Otros genes comúnmente mutados en el transcurso de este proceso son los genes **DCC**, **SMAD2** y **SMAD4**, que se localizan en el cromosoma 18q. El gen **DCC** es un gen supresor de

tumores que codifica para una proteína transmembrana presente en la mayoría de los epitelios participando en la interacción célula-célula o célula-sustrato. Las proteínas SMAD2 y SMAD4 participan en la ruta de TGF- $\beta$  que participa en el crecimiento y apoptosis. Durante el evento de carcinogénesis, con frecuencia ocurre una pérdida del cromosoma 18q, perdiéndose así las funciones de estas proteínas. El 60% de los CCR presentan una pérdida alélica en este sitio (Vogelstein et al., 1988).

Otro evento que ocurre frecuentemente en la progresión tumoral por inestabilidad cromosómica consiste en la delección del cromosoma 17p que contiene el gen supresor de tumores **TP53**. La inactivación de este gen generalmente es un evento tardío en la ruta CIN y acompaña la transición de adenoma a adenocarcinoma. A medida que el tumor avanza desde el punto de vista histológico, la frecuencia de mutación en este gen aumenta. Así, los adenomas presentan una frecuencia de mutación del 4-26%, los adenomas con focos invasivos un 50% y los carcinomas un 50-75% (Leslie et al., 2002). La proteína p53 induce la expresión de genes del ciclo celular, conduciendo a una ralentización del ciclo celular para proporcionar el tiempo suficiente para la reparación del ADN. Además, cuando el daño genético es sostenido y demasiado extenso para ser reparado por la célula, p53 induce la expresión de genes proapoptóticos (Mills, 2005).

Cabe mencionar que solo una pequeña minoría de los tumores colorrectales que emergen a través de la vía CIN presentan todas las anormalidades genéticas mencionadas (Smith et al., 2002). Es posible que algunos de estos eventos mutacionales sean sustituidos por otras aberraciones genéticas o epigenéticas. Estas anomalías genéticas podrían darse de forma adicional, alternativa o complementaria a las aberraciones tradicionalmente descritas en la secuencia adenoma-carcinoma.

## **ii) Vía de inestabilidad de microsatélites**

Los microsatélites consisten en repeticiones cortas de uno, dos o tres nucleótidos en una secuencia que se distribuyen a lo largo de todo el genoma humano. Existen aproximadamente 200 microsatélites en el genoma y el patrón de microsatélites para cada individuo es único (Gyapay et al., 1994). Si la replicación del ADN se realiza correctamente, el individuo mantiene el mismo patrón de microsatélites en cada célula. Sin embargo, cuando ocurre una disfunción en los sistemas de reparación del ADN, la enzima ADN polimerasa comete errores al copiar estas

secuencias repetidas cortas y se produce lo que se denomina “inestabilidad de microsatélites”, IM (microsatélites que difieren del tejido somático normal).

La vía de inestabilidad de microsatélites (*MicroSatellite Instability, MSI*) es otra ruta de gran importancia que conduce al desarrollo de CCR y resulta de una mutación germinal en un gen que participa en la reparación del ADN. En este caso, la inestabilidad de microsatélites se traduce en una discrepancia en el número de microsatélites en el tumor comparado con el ADN germinal.

Existen casos de CCR que tienen el sistema de reparación intacto y sin embargo presentan mutaciones en un pequeño número de microsatélites. Por este motivo, para lograr una uniformidad de definición que sea útil en la práctica clínica, se ha diseñado un panel de microsatélites estandarizado (Boland et al., 1998). Dicho panel incluye dos mononucleótidos y tres dinucleótidos. Un tumor se considera con alta inestabilidad de microsatélites (*MSI-high*) cuando de estos cinco sitios específicos existe inestabilidad en dos o más sitios  $MSI \geq 2$ ; y de baja inestabilidad (*MSI-low*) cuando la inestabilidad ocurre en un solo sitio.

Un ejemplo de cáncer que se desarrolla en su totalidad mediante la vía MSI es el síndrome de Lynch o cáncer colorrectal hereditario no polipósico (ver “Cáncer de colon hereditario”). Sin embargo, existen casos de CCR esporádico que también se desarrollan mediante este vía.

### iii) **Vía del fenotipo metilador de islas CpG o vía “serrada”**

Las islas CpG son regiones del ADN que conforman aproximadamente el 40% de las regiones promotoras de genes en mamíferos. Estas regiones contienen niveles elevados de pares citosina-guanina con enlaces fosfato (de allí el nombre CpG). Los genes que se expresan presentan los sitios CpG no metilados mientras que los genes que se encuentran inhibidos presentan metilación de las islas CpG en sus zonas promotoras.

Otro mecanismo que contribuye al desarrollo de tumores de colon es la vía de fenotipo metilador de islas CpG” (*CpG Island Methylator Phenotype, CIMP*). En este mecanismo frecuentemente se metilan las regiones promotoras de genes supresores de tumores, lo que conduce a la inactivación de estos genes supresores y desarrollo del tumor. En el caso de la carcinogénesis colorrectal, esta ruta se designa también “vía serrada” debido a que el punto de

partida consiste en una lesión precursora que presenta un aspecto de “sierra” bien caracterizada desde el punto de vista histológico (se forman pólipos hiperplásticos, pólipos sésiles serrados y adenomas serrados) (Perea et al., 2011).

La vía de fenotipo metilador es la segunda vía en importancia que lleva al desarrollo de CCR esporádico detrás de la vía CIN y representa aproximadamente el 15% de los casos de CCR esporádico (Issa, 2008). Los tipos CCR más comunes que emergen mediante esta ruta se inician mediante una mutación activadora en el gen *BRAF*, que activa la vía RAF/MEK/ERK (ver “vía de señalización RAF/MEK/ERK”).

Al igual que se ha diseñado un panel de microsatélites estandarizado de referencia, se ha intentado diseñar un panel de marcadores de metilación de islas CpG, con la finalidad de clasificar a un determinado CCR en positivo o negativo para el fenotipo metilador en base a un determinado punto de corte. Sin embargo, hasta la fecha no existe un panel universal respaldado de marcadores CIMP (Worthley and Leggett, 2010).

### **CCR hereditario**

El CCR puede ser esporádico o hereditario. Se estima que aproximadamente el 30% de todos los casos de CCR consisten en una forma heredada de la enfermedad. (Lynch and de la Chapelle, 2003). Aproximadamente el 5% de los casos están asociados a mutaciones hereditarias altamente penetrantes bien caracterizadas. Sin embargo, la mayor parte de los casos de CCR hereditario se deben a mutaciones menos penetrantes pero más comunes y en muchos casos no se conoce con exactitud la etiología de la enfermedad. La identificación de los genes del CCR hereditario es vital para identificar los pacientes de alto riesgo, mejorar las estrategias de prevención y desarrollar mejores métodos de diagnóstico y terapéuticos (Jasperson et al., 2010).

Cada tipo de síndrome de CCR hereditario se define en función de hallazgos clínicos, patológicos y genéticos. Algunos de estos síndromes se caracterizan por la presencia de pólipos adenomatosos (Síndrome de Lynch, poliposis adenomatosa familiar y la poliposis asociada a *MUTYH*); mientras que en otros síndromes, la lesión primaria consiste en pólipos hamartomatosos (síndrome de Peutz-Jeghers y síndrome de poliposis juvenil) (Jasperson et al., 2010). El término de pólipo hamartomatoso proviene del griego “hamarta” (defecto) y “oma” (tumor) y consiste en una proliferación aberrante de las células que conduce a la formación de

masas celulares o nódulos benignos. A continuación se describirá brevemente cada uno de los síndromes.

**i) Síndrome de Lynch:** se le conoce también como CCR hereditario no polipósico (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer, HNPCC*). Los individuos con síndrome de Lynch están predispuestos a padecer varios tipos de cáncer especialmente cáncer de colon (Lynch and de la Chapelle, 2003). Estos pacientes se caracterizan por la presencia de una mutación germinal en los genes que codifican para el sistema de reparación del ADN (*Mismatch Repair, MMR*), con lo cual dicho sistema es defectuoso (Rustgi, 2007). Una característica en estos individuos es la presencia de una elevada inestabilidad de microsatélites (H-MSI), entre otras. De hecho, una de las formas de identificar pacientes con el síndrome de Lynch consiste en detectar si existe MSI ya que el 90% de estos individuos presentan este fenotipo. Sin embargo se debe tener en cuenta que aproximadamente el 15% de los CCR esporádicos también pueden presentar MSI (Jasperson et al., 2010).

**Poliposis Adenomatosa Familiar, PAF (*Familial Adenomatous Polyposis, FAP*).** La PAF está causada por una mutación germinal en el gen *APC*, que codifica para una proteína supresora de tumores que forma parte de la vía de señalización Wnt, como se describió en el apartado anterior. Existe una forma clásica y atenuada de la enfermedad (Jasperson et al., 2010). La forma clásica se caracteriza por la aparición de cientos a miles de adenomas de colon, comienza a una edad temprana y se desarrolla cáncer si la enfermedad no es tratada a tiempo. En la forma atenuada de la enfermedad se desarrollan un número menor de pólipos ( $\leq 100$ ) que aparecen en edades más avanzadas (Burt et al., 2004).

**Poliposis Asociada a MUTYH, PAM (*MUTYH Associated Polyposis, MAP*):** La PAM se caracteriza por una mutación en el gen *MUTYH*, el cual codifica para una proteína que forma parte de la vía de reparación de escisión de bases, que tiene un papel en la defensa del daño del ADN por oxidación. La enfermedad se caracteriza por la presencia de pólipos adenomatosos en el colon y recto y un elevado riesgo de padecer CCR (Venesio et al., 2012).

**Síndrome de Peutz-Jeghers, SP-J (*Peutz-Jeghers Syndrome, PJS*) y Síndrome de Poliposis Juvenil, SPJ (*Juvenile Polyposis Syndrome, JPS*):** El Síndrome de Peutz-Jeghers (SP-J) y el Síndrome de Poliposis Juvenil (SPJ) se caracterizan por presentar pólipos hamartomatosos en lugar de pólipos adenomatosos. Ambos síndromes se asocian con un elevado

riesgo de contraer CCR y otros tipos de cáncer (Schreibman et al., 2005). En el caso de **SP-J** el riesgo de contraer cáncer gastrointestinal es del 70%. Dicha enfermedad se debe a una mutación en el gen *STK11* (*Serine/Threonine Kinase 11*) (o *LKB1*) (Gammon et al., 2009). Por otra parte, la característica más relevante del **SPJ** consiste en el desarrollo de una poliposis múltiple juvenil en el colon, así como también en el intestino delgado y estómago. La enfermedad es causada por una mutación en el gen *SMAD4* o *BMPRIA* (*Bone Morphogenetic Protein Receptor type IA*) (Gammon et al., 2009).

### **Patrón de metástasis del CCR**

El adenocarcinoma colorrectal comienza como un tumor localizado en la superficie del tubo digestivo (mucosa) que va creciendo e invadiendo posteriormente las capas más profundas como la submucosa muscular hasta alcanzar la serosa. Cuando el tumor traspasa la pared del intestino puede invadir cualquier órgano, ya sea abdominal o a distancia mediante diseminación linfática o sanguínea:

La **diseminación linfática** ocurre cuando las células tumorales alcanzan la red de vasos linfáticos que rodea al colon que permiten el drenaje de la linfa a múltiples regiones ganglionares. La diseminación por esta vía se realiza de forma ordenada, afectando primero a los ganglios más próximos y posteriormente a los más alejados.

La **diseminación hematológica** ocurre cuando las células tumorales pasan al torrente circulatorio y se diseminan hacia otros órganos. Generalmente el primer sitio de diseminación de este tumor por la vía sanguínea es el hígado, seguido por los pulmones y huesos. Esto se debe a que el drenaje venoso del tracto intestinal se produce a través del sistema porta. Sin embargo, los tumores que se originan en el recto distal pueden dar lugar a una metástasis inicial en los pulmones debido a que la vena rectal inferior drena en la vena cava inferior y no en el sistema venoso portal (información extraída de [www.aecc.es](http://www.aecc.es)).

### **Métodos de detección de CCR**

Existen varios métodos de detección del CCR y su importancia radica en detectar la enfermedad en sus fases iniciales o de premalignidad. El gran problema de esta enfermedad consiste en la ausencia de síntomas en sus fases más tempranas, con lo cual se debe concienciar a



la población y desarrollar programas de prevención con la finalidad de detectar pólipos o neoplasias en estadios tempranos. A continuación se describen los métodos de detección más utilizados:

El **examen de sangre oculta en heces** detecta pérdidas de sangre sutiles en las heces que provienen del tracto gastrointestinal, lo que puede deberse a CCR así como a otro tipo de patologías como las úlceras y el cáncer gástrico (Hewitson et al., 2008; Cunningham et al., 2010) (Hardcastle et al., 1996; Kronborg et al., 1996). Específicamente, consiste en la detección de la actividad pseudoperoxidasa del grupo hemo, ya sea como hemoglobina intacta o grupo hemo libre. Este método presenta la desventaja de que no es un ensayo específico para la hemoglobina humana (Di et al., 2013).

La **sigmoidoscopia flexible (SF)** es una técnica mínimamente invasiva que permite examinar el intestino grueso desde el recto hasta el colon. Es similar a la colonoscopia con la diferencia que sólo se examina hasta el sigmoide, la parte más distal del colon, mientras que la colonoscopia examina la totalidad del intestino grueso (Cunningham et al., 2010). Además, su sensibilidad es del 60% al 70% comparado con la colonoscopia. Por estos motivos, el uso de la SF ha disminuido en los últimos tiempos como técnica de detección (Atkin et al., 2010).

La **colonoscopia** consiste en un examen endoscópico del intestino grueso y de la parte distal del intestino delgado mediante una cámara CCD (*Charge-Coupled Device*, dispositivo de carga acoplada) o una cámara de fibra óptica en un tubo flexible que se pasa a través del ano del paciente. La colonoscopia es considerada en la actualidad como el estándar de oro para la detección de CCR, ya que permite la visualización del colon en su totalidad, así como también la extirpación de adenomas con potencial de transformarse en células malignas. Además, los pequeños trozos de tejido extraídos pueden ser analizados en caso de lesiones sospechosas (Debarros and Steele, 2013).

La **colonoscopia virtual**, descrita por primera vez en el año 1994, es un procedimiento que utiliza rayos X con la finalidad de producir una imagen bi y tridimensional del colon desde el recto hasta la parte inferior del intestino delgado (Zauber et al., 2008). Una desventaja de este método es que no permite la extracción de tejido para posterior análisis, con lo cual si se visualizan anomalías en el tejido se deberá hacer una colonoscopia convencional



posteriormente. Sin embargo, esta técnica presenta la ventaja que el paciente no requiere sedación para el examen.

### **Estadificación del cáncer colorrectal**

Una vez detectado el cáncer colorrectal se realizan diferentes pruebas para determinar si el tumor se encuentra localizado o si se ha diseminado hacia otros órganos, proceso que se denomina estadificación. Los principales procedimientos se describen a continuación:

**Exploración por TAC (Tomografía Axial Computarizada):** consiste en tomar una serie de imágenes del cuerpo, como el abdomen, que son creadas por un ordenador conectado a una máquina de rayos X. Se ingiere o se inyecta un colorante en una vena a fin de que los órganos o los tejidos se destaquen más claramente (Zbar et al., 2007).

**IRM (Imagen por Resonancia Magnética):** se utiliza un imán, ondas de radio y un ordenador para crear imágenes detalladas de áreas internas del colon. Se inyecta al paciente una sustancia llamada gadolinio a través de una vena, y éste se acumula alrededor de las células cancerosas para hacerlas aparecer más brillantes en la imagen (Rollven et al., 2013).

**TEP (Tomografía por Emisión de Positrones):** se inyecta en una vena glucosa radiactiva y el explorador TEP rota alrededor del cuerpo y toma una imagen de los lugares que absorben la glucosa. Las células tumorales tienen un aspecto más brillante en la imagen porque son más activas y absorben más glucosa que las células normales (Kosugi et al., 2008).

**Radiografía de abdomen:** utiliza rayos X los cuales atraviesan el cuerpo y se plasman en una película que muestra una imagen de órganos y huesos del cuerpo (Izquierdo et al., 1993).

**Biopsia de ganglios linfáticos:** consiste en extracción de parte o de todo el ganglio linfático. Un patólogo observa el tejido al microscopio para determinar si hay presencia de células cancerosas.

**Medida del Antígeno Carcino-Embrionario (ACE) en sangre:** El ACE se libera en el torrente sanguíneo tanto por las células cancerosas como por las células normales. Cuando se

encuentra en cantidades más elevadas de lo normal, puede ser un signo de cáncer colorrectal u otras afecciones (Albanopoulos et al., 2000).

### Fases del cáncer del colorrectal

Una vez que el paciente es diagnosticado con cáncer colorrectal y realizada la estadificación para conocer la extensión del tumor, se procede a determinar el tipo de tratamiento más adecuado para el paciente. Para ello, es importante clasificar el tumor, es decir, determinar en qué estadio o fase se encuentra. Los dos sistemas de clasificación más utilizados en el cáncer de colon y recto son la clasificación TNM (Edge and Compton, 2010) y la clasificación de Astler y Coller (Kajitani et al., 1981). A continuación se describirá la clasificación TNM por ser la que tomaremos como referencia en el transcurso de este trabajo.

El **sistema de clasificación TNM** fue desarrollado por el Comité de Unión Americana en Cáncer (*American Joint Committee in Cancer, AJCC*) y la Unión Internacional contra el cáncer (*International Union Against Cancer, IUAC*) y clasifica al tumor en base a tres variables: el grado de penetración del tumor primario a través de las paredes del intestino (**T**), el número de ganglios regionales afectados por el tumor (**N, *nodes***) y la presencia de metástasis distantes (**M**), lo que se denomina en conjunto clasificación TNM. En la Tabla 1 y 2 se resume la clasificación más reciente que ha sido revisada por la AJCC en el año 2010:

<b>TUMOR PRIMARIO (T)</b>	
<b>T0</b>	No existe evidencia de tumor primario
<b>Tis</b>	Tumor “in situ”, confinado a la mucosa o invasión solamente de la lámina propia
<b>T1</b>	Tumor invade submucosa
<b>T2</b>	Tumor invade muscularis propia
<b>T3</b>	Tumor atraviesa muscularis propia hacia tejidos pericólicas (subserosa o tejidos grasos)
<b>T4a</b>	Tumor penetra la superficie del peritoneo visceral
<b>T4b</b>	Tumor invade o se adhiere a otros órganos o estructuras

NÓDULO REGIONAL (NLR)	LINFÁTICO
<b>N0</b>	Ausencia de afectación de NLR
<b>N1</b>	Metástasis en 1 NLR
<b>N1a</b>	Metástasis en 1-3 NLR
<b>N1b</b>	Metástasis en 2 o 3 NLR
<b>N1c</b>	Depósitos de tumor en la subserosa, mesenterio, tejidos pericólicas sin NLR
<b>N2</b>	Metástasis en 4 o más NLR
<b>N2a</b>	Metástasis en 4-6 NLR
<b>N2b</b>	Metástasis en 7 o más NLR

METÁSTASIS DISTANTE	
<b>M0</b>	Sin metástasis a distancia
<b>M1</b>	Metástasis a distancia
<b>M1a</b>	Metástasis confinada a un órgano o sitio (por ejemplo, hígado, pulmón, ovario o nódulo no regional)
<b>M1b</b>	Metástasis en más de un órgano o sitio o en el peritoneo

**Tabla 1: Sistema de clasificación TNM** (Obtenido del *Cancer staging manual*, 7<sup>th</sup> edition, (Edge and Compton, 2010).

Posteriormente, en base a los valores TNM obtenidos, se clasifica al tumor en cuatro estadios o fases: fase 0, I, II, III y IV (Tabla 2):

**Fase 0 o carcinoma in situ (Tis, N0, M0):** es la fase más temprana del cáncer de colon. Las células tumorales se localizan en la superficie de la mucosa y en ningún caso la traspasa (Tis), los ganglios no están afectados (N0) y no existe metástasis a distancia (M0).

**Fase I (T1 ó T2, N0, M0):** el tumor invade la submucosa (T1) o muscularis propia (T2) sin traspasar la capa muscular. No existe afectación de ganglios linfáticos (N0) ni metástasis a distancia (M0).

**Fase II:** el tumor atraviesa la muscularis propia hacia tejidos pericólicas (**fase IIa**), penetra la superficie del peritoneo visceral (**fase IIb**) o llega a invadir o adherirse a otros órganos o estructuras próximas (**fase IIc**). En ninguno de los tres casos se aprecia afectación ganglionar (N0) ni metástasis a distancia (M0).

**Fase III:** en términos generales se puede decir que en este estadio, el cáncer ha invadido los órganos más próximos afectando a los ganglios linfáticos en mayor o menor medida. Dicha fase se subdivide en tres subfases (**IIIa, IIIb y IIIc**) en base al tipo de estructura u órgano invadido (muscularis propia, subserosa, tejidos grasos pericorrectales, peritoneo visceral u otros órganos próximos) y al número de ganglios afectados por el tumor. En la tabla se recogen los detalles de esta fase.

**Fase IV:** el cáncer se ha diseminado afectando a órganos alejados del colon como el hígado, pulmón o huesos. Esta fase se subdivide en dos subfases: en la subfase **IVa** la metástasis está confinada en un órgano o sitio, mientras que en la subfase **IVb** existe metástasis en más de un órgano.

ETAPA ANATÓMICA/GRUPOS PRONÓSTICOS			
FASE	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>IIA</b>	T3	N0	M0
<b>IIB</b>	T4a	N0	M0
<b>IIC</b>	T4b	N0	M0
<b>IIIA</b>	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0
<b>IIIB</b>	T3-T4a	N1/N1c	M0
	T2-T3	N2a	M0
	T1-T2	N2b	M0
<b>IIIC</b>	T4a	N2a	M0
	T3-T4a	N2b	M0
	T4b	N1-N2	M0
<b>IVA</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1a
<b>IVB</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1b

**Tabla 2: Sistema de clasificación TNM** (Obtenido de Cancer staging manual, 7<sup>th</sup> edition) (Edge and Compton, 2010).

### Elección del tipo de tratamiento para un paciente con CCR

Una vez determinada la fase del cáncer colorrectal, el especialista recomienda al paciente el plan de tratamiento más adecuado. Los protocolos existentes en los hospitales, son empleados de forma generalizada y son aplicados en función de la extensión del tumor y de las características y

el estado general del paciente. Por ejemplo, se debe tener en cuenta si además de cáncer de colon o recto, existen otras enfermedades importantes que puedan dificultar la realización de algún tratamiento específico. Por tanto, el tratamiento propuesto por el especialista no es el mismo en todos los pacientes.

### **Terapia citotóxica y terapia dirigida**

Los tratamientos quimioterapéuticos pueden ser clasificados en terapias citotóxicas y terapias dirigidas en base al tipo de diana sobre la cual actúan:

La **terapia citotóxica**, también denominada quimioterapia tradicional o convencional utiliza agentes que tienen como diana el ADN de la célula, induciendo daño, interfiriendo en su síntesis o replicación, entre otros efectos. Como resultado, se destruyen prioritariamente las células que se dividen rápidamente, una característica crítica de las células tumorales. Sin embargo, la terapia citotóxica también tiene un efecto importante sobre las células normales, sobre todo aquellas células que se multiplican a gran velocidad, como los folículos pilosos, médula ósea, mucosa intestinal y el sistema reproductor. Esta característica es la responsable de la mayor parte de los efectos tóxicos y secundarios de este tipo de terapia, tales como la pérdida de cabello, mielosupresión y diarrea, entre otros. A pesar de ello, la terapia citotóxica ha brindado grandes beneficios a los pacientes con cáncer.

En CCR, la terapia citotóxica incluye compuestos como el 5-fluoracilo, capecitabina, oxaliplatino, leucovorina e irinotecan. El **5-fluoracilo (5-FU)** inhibe la enzima timidilato sintasa, que participa en la biosíntesis de pirimidinas. Como resultado se inhibe la síntesis de ADN y la división celular (Kohne and Peters, 2000). La **capecitabina** es un precursor oral del 5-FU que es absorbido eficazmente por el tracto gastrointestinal y convertido en 5-FU en el organismo. El **oxaliplatino (OXA)** es un compuesto de platino que promueve la formación de aductos platino-ADN inhibiendo así la replicación del ADN (Reardon et al., 1999). El **irinotecan** y su metabolito activo, SN38, se unen al complejo ADN/topoisomerasa tipo I, lo estabilizan y evitan el resellado de los cortes que se producen en el ADN, lo que es un evento crítico para la relajación del ADN y replicación. Así, el SN-38 inhibe la topoisomerasa y como resultado el ADN no se resella, permanece dañado y se inhibe la replicación llevando a la muerte celular (Armand et al., 1995).

En los últimos años, la quimioterapia se ha focalizado en la llamada “**terapia dirigida**”, que consiste en un tratamiento dirigido a un blanco o a una vía biológica definida. La mayoría de los agentes “dirigidos” están diseñados para actuar sobre proteínas que se encuentran sobreexpresadas en el tumor, como las que forman parte de las vías RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. En función de esto, las terapias dirigidas serían más específicas para las células tumorales, con lo cual las células normales sufren menos daño, se reducen los efectos secundarios y se mejora la calidad de vida del paciente. Sin embargo, las terapias dirigidas muestran limitaciones, siendo la principal de ellas, la resistencia desarrollada por los tumores frente a estas terapias. Esto puede ocurrir por ejemplo, por aparición de una mutación en el gen que codifica para la proteína diana. Como resultado, la configuración de la proteína se altera y el fármaco puede dejar de unirse o unirse ineficientemente. Por dicho motivo, muchas veces las terapias dirigidas funcionan mejor en combinación, ya sea con otras terapias dirigidas o con tratamientos citotóxicos.

En los últimos años, las terapias contra el CCR han sufrido una transición, ya que inicialmente la enfermedad se trataba con agentes citotóxicos y hoy en día se realizan terapias de combinación de terapias citotóxicas y dirigidas. Las terapias dirigidas aprobadas hasta la fecha por la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos incluyen el cetuximab, panitumumab, bevacizumab, regorafenib y aflibercept. En el siguiente apartado se describirán los principales compuestos citotóxicos y dirigidos aprobados para el tratamiento de cáncer CCR.

### **Tipos de tratamiento en cáncer de recto**

El cáncer de recto difiere principalmente del cáncer de colon en el tipo de tratamiento empleado y en algunas técnicas utilizadas para su diagnóstico. Las diferencias en el tratamiento incluyen principalmente el uso de radioterapia, la técnica quirúrgica utilizada y los tipos de fármacos empleados. Además en el caso del cáncer de recto se deben considerar los aspectos terapéuticos relacionados al mantenimiento o restauración del esfínter anal, las funciones genitourinarias y sexuales (Decanini-Teran et al., 2011).

### **Tipos de tratamiento en cáncer de colon**

Los tratamientos empleados en el cáncer de colon son la resección quirúrgica y la quimioterapia citotóxica y dirigida. La resección quirúrgica suele ser el tratamiento más

importante y el primero en llevarse a cabo en la mayoría de los casos y consiste en la extirpación del segmento del colon afectado, así como un tramo de tejido normal a cada lado de la lesión y los ganglios linfáticos correspondientes. El tipo de tratamiento en cáncer de colon depende principalmente de la fase en la que se encuentra el tumor:

En el caso de tumores en **fase 0** (carcinoma in situ en la superficie de la mucosa) generalmente se realiza una escisión local o una simple poliplectomía.

Si el tumor está en **fase I** (invasión de submucosa o muscularis propia) el tipo de tratamiento estándar consiste en una resección quirúrgica más amplia y anastomosis. Hasta la fecha, esta fase de tumor tiene un pronóstico muy bueno y no existen datos convincentes que apoyen la terapia adyuvante.

Si el tumor está en **fase II**, se debe realizar cirugía amplia con anastomosis. En el caso de estos tumores, existe gran controversia si el uso de quimioterapia adyuvante (quimioterapia aplicada tras la cirugía) es beneficiosa o no para el paciente (Oyan, 2012). Si bien en algunos casos la quimioterapia adyuvante ha mostrado reducir el riesgo de recaída y muerte tras la cirugía, en otros casos no parece brindar ningún tipo de beneficio al paciente. Además en ocasiones, los pacientes que son sometidos a cirugía exclusivamente tienen un buen pronóstico. Por ejemplo, resultados del estudio MOSAIC no mostraron mejoras en la SLE (Supervivencia Libre de Enfermedad, *Disease-Free Survival, DFS*) ni en la SG (Supervivencia Global, *Overall Survival, OS*) en los pacientes con tumores en fase II, al incluir la terapia adyuvante al tratamiento (Andre et al., 2006). Sin embargo, algunos estudios han demostrado un leve beneficio al incluir terapias adyuvantes en los pacientes con tumores en fase II de alto riesgo (Gray et al., 2007). En función de estos resultados, en general se recomienda determinar si el paciente es de alto o bajo riesgo y sólo aplicar quimioterapia adyuvante en aquellos de alto riesgo. El mayor determinante para clasificar a un paciente de alto o bajo riesgo es el grado de penetración de las células tumorales a través de la serosa, siendo los pacientes con tumores en fase IIb de alto riesgo. En ambos casos (alto y bajo riesgo) se le puede recomendar al paciente que se apunte en ensayos clínicos aleatorios para evaluar nuevas opciones de terapia adyuvante.

En los casos de tumores en **fase III** no existe ninguna duda del beneficio de la terapia adyuvante. Presumiblemente, esto se deba a que la terapia adyuvante consigue eliminar las

micrometástasis que no han podido ser detectadas en la cirugía. A continuación se describen los tipos de terapia adyuvante utilizadas en estos pacientes.

### **Quimioterapia adyuvante en tumores en fase III y IV**

El estudio pionero sobre el posible beneficio de la terapia adyuvante en pacientes en fases II y III de cáncer de colon fue el Proyecto Nacional de Cirugía Adyuvante en mama e intestino, conocido como NSABP (*National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project*). Desde sus inicios, dicho proyecto fue apoyado por el Instituto Nacional del Cáncer, INC, de Estados Unidos (*National Cancer Institute, NCI*) y hoy consiste en un grupo cooperativo con más de 50 años de historia diseñando ensayos clínicos a gran escala con la finalidad de mejorar los tratamientos de cáncer de colon y mama (<http://www.nsabp.pitt.edu>).

En la década de los setenta, el NSABP inició el primer estudio prospectivo aleatorio para investigar el papel de la quimioterapia adyuvante en el manejo del cáncer de colon resecado con intención curativa. Este estudio demostró que la quimioterapia adyuvante brindaba un beneficio significativo en la SG y SLE en pacientes con cáncer de colon en fase II y III (Wolmark et al., 1988).

En el año 1990, Charles Moertel y colaboradores observaron que la terapia adyuvante basada en **5-FU/levamisol** (derivado sintético del imidazotiazol) durante 12 meses aumentaba la SG y la SLE (Moertel et al., 1990), con lo cual se concluye que éste debe ser el tratamiento estándar para pacientes con carcinoma de colon en fase III (Moertel et al., 1995b; Moertel et al., 1995a). En función de estos resultados, el INC de Estados Unidos dio el paso al primer consenso sobre la terapia adyuvante en cáncer de colon en fase III, recomendándose un régimen basado en 5-FU y levamisol como terapia estándar.

Debido a que el mecanismo de acción del levamisol era desconocido, se propuso que podría tratarse de un compuesto no activo. Esto llevó a la sustitución del régimen 5-FU/levamisol durante 12 meses por el esquema adyuvante **5-FU/leucovorina** durante 6 meses que resultó igual de efectivo. La leucovorina es un folato que estabiliza la interacción del 5-FU con la enzima timidilato sintetasa. Así, 5-FU/leucovorina se convirtió en la terapia consenso en pacientes con cáncer de colon en fase III hasta el año 2004 (Haller et al., 2005).



### i) Terapias adyuvantes aprobadas por la FDA para tumores en fase III

Los ensayos clínicos llevados a cabo desde los inicios de la década de los setenta permitieron mejorar los tratamientos quimioterapéuticos y condujeron a la aprobación por la FDA de varios compuestos utilizados como monoterapia o en combinación. A continuación se mencionarán brevemente algunos de ellos.

**FOLFOX4 (5-FU/leucovorina/oxaliplatino):** En el año 2004, la FDA aprueba el uso de 5-FU y leucovorina (infusión) en combinación con oxaliplatino (inyección) como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III (Eloxatin™, Sanofi-Synthelabo, Inc.). La combinación 5-FU/leucovorina/oxaliplatino recibió la denominación de esquema **FOLFOX4** y su aprobación se basó en el estudio MOSAIC (*Multicenter international study of 5-FU/leucovorin/oxaliplatin in the adjuvant treatment of colon cancer*). Este ensayo clínico a gran escala reclutó 2,246 pacientes con cáncer de colon en fase II o III previamente sometidos a resección quirúrgica con intenciones curativas. Se concluye que 5-FU/leucovorina/oxaliplatino mejora la SLE a 3 años, respecto a la combinación 5-FU/leucovorina (Andre et al., 2004). En el año 2009 se publican los resultados finales del estudio MOSAIC en el cual se realiza un seguimiento más prolongado de los pacientes respecto al trabajo publicado en el año 2004. Se observa que el régimen FOLFOX4 aumenta la SLE a 5 años respecto al último estudio y que los pacientes presentan una supervivencia global de 6 años. Sin embargo, no se detectan diferencias en la SLE y SG en los pacientes con tumores de colon en fase II. De acuerdo a estos resultados, la FDA aprueba el esquema FOLFOX4 como tratamiento adyuvante estándar a nivel mundial para pacientes con cáncer colon en estadio III (Labianca et al., 2010).

**Capecitabina:** El estudio de la capecitabina como terapia adyuvante se inició en el año 1998 en el ensayo clínico X-ACT, que compara el uso de la capecitabina con el esquema 5-FU/leucovorina (5-FU/LV). La capecitabina demostró ser equivalente a 5-FU/LV en términos de SLE, observándose una SLE de 3 años (Twelves et al., 2005; Scheithauer et al., 2003). En función de estos resultados, la FDA aprueba la capecitabina en el año 2005 como monoterapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III (Xeloda®, Hoffman-LaRoche Inc.). Los resultados finales de este ensayo se recogen en un estudio publicado en el año 2012, en el cual se realiza un seguimiento de los pacientes más prolongado y se observa que la SLE aumenta a 5 años (Twelves et al., 2012). Además de su efectividad, se comprueba también una mayor tolerancia respecto al bolo 5-FU/LV, inclusive en pacientes mayores de 70 años. Además

presenta la ventaja de ser administrada de forma oral, a diferencia del 5-FU que es administrado por vía intravenosa. Este tipo de terapia se recomienda en los pacientes que requieran por algún motivo una terapia basada en fluoropiridimidinas exclusivamente.

**XELOX (capecitabina/oxaliplatino):** La combinación capecitabina/oxaliplatino ha sido evaluada en diversos contextos de dosis y protocolos. Un estudio que compara XELOX y FOLFOX4 como terapia adyuvante en pacientes con cáncer de colon en fase III muestra que XELOX mantiene su eficacia y seguridad y es altamente tolerable por los pacientes (Diao et al., 2008).

**Irinotecan** ha sido aprobado para su uso de forma individual o en combinación con otros compuestos para el tratamiento de cáncer de colon en fase III y metastásico, incluso en recidivas o en algunos tipos de tumores en los que otros tipos de tratamientos no han resultado beneficiosos (Papadimitriou et al., 2011).

**Bevacizumab y cetuximab:** La adición de bevacizumab y cetuximab en el tratamiento de pacientes con CCRm ha mejorado su supervivencia, por lo que se pensó que la adición de estos agentes en pacientes con tumores en fase III o II de alto riesgo podría brindar beneficios. Sin embargo, los resultados de los ensayos clínicos fueron poco motivadores. Se ha observado incluso que el uso de bevacizumab o cetuximab como terapia adyuvante pueden inducir resistencia en un elevado número de pacientes (de et al., 2011).

## ii) Terapias aprobadas por la FDA para tumores en fase IV

En la **fase IV o CCRm** la quimioterapia es el tratamiento más importante. En estos casos, en ocasiones es posible realizar una resección quirúrgica completa de las metástasis y otras veces no, debido a estados muy avanzados de la enfermedad. Cuando es posible la cirugía, la supervivencia se prolonga de forma significativa. Hasta la fecha existen varios compuestos y esquemas de combinación de fármacos aprobados por la FDA para su uso en cáncer de colon en fase IV. Se mencionarán brevemente algunos de ellos:

**Cetuximab (CTX)**, es un anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*). CTX ha brindado un beneficio adicional importante a los pacientes con CCRm mejorando el índice de supervivencia

de una media inferior a seis meses a una supervivencia de aproximadamente 24 meses (Cunningham et al., 2004). En el año 2004, la FDA aprobó su uso en combinación con **irinotecan** para el tratamiento de pacientes con CCRm que expresan EGFR (Erbix®<sup>®</sup>, Imclone Systems, Inc.). En el año 2007, se aprueba su uso como monoterapia para el tratamiento de pacientes intolerantes o refractarios a las terapias basadas en irinotecan. En julio del 2012, la FDA aprueba su utilización en combinación con **FOLFIRI** (5-FU/leucovorina/irinotecan) como primera línea de tratamiento de pacientes con CCRm con *KRAS* salvaje y que expresen EGFR. Dicha aprobación se basó el ensayo aleatorio CRYSTAL, el cual reclutó pacientes que expresaban EGFR y que no habían recibido quimioterapia previa. Se clasificó a los pacientes en base al estado mutacional en *KRAS* y un grupo recibió CTX y FOLFIRI y otro grupo FOLFIRI exclusivamente (independientemente del estado mutacional de *KRAS*). La adición de CTX condujo a una mejora en la SG y SLE en los pacientes con *KRAS* salvaje (Lyseng-Williamson, 2012).

**Panitumumab**, es un anticuerpo que inhibe el receptor EGFR. Fue aprobado en el año 2006 (Vectibix™; Amgen, Inc.) para el tratamiento de pacientes con CCRm que expresan EGFR. Dicha aprobación se basó en un estudio multinacional aleatorio en donde un grupo de pacientes recibía la mejor atención de apoyo y a otro grupo se le añadía el uso de panitumimab. En éste último grupo, la adición de panitumumab mejoró la supervivencia libre de progresión, SLP (la enfermedad no se cura pero no empeora) (Hoy and Wagstaff, 2006).

**Bevacizumab**, es un anticuerpo monoclonal que inhibe el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor, VEGF*), evitando la formación de nuevos vasos sanguíneos. Bevacizumab fue aprobado por la FDA en el año 2004 como primera línea de tratamiento para pacientes con CCRm (Avastin®, Genentech, Inc.). La seguridad y eficacia de bevacizumab fue demostrada en un ensayo clínico aleatorio en el que un grupo de pacientes recibía la quimioterapia estándar FOLFIRI (5-FU/leucovorina/irinotecan) y la otra mitad recibía bevacizumab intravenoso y FOLFIRI. En estos últimos se observó una mejora en la supervivencia de 5 meses (Reddy, 2005). En el año 2006, la FDA aprueba el uso de bevacizumab en combinación FOLFOX4 como segunda línea de tratamiento de CCRm.

**Regorafenib** es un inhibidor oral de molécula pequeña que inhibe varias tirosín quinasas implicadas en la angiogénesis y proliferación celular, tales como VEGFR, el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) y

RAF, entre otros. Fue aprobado en el año 2012 (Stivarga<sup>®</sup>, Bayer Health Care Pharmaceuticals, Inc.) para el tratamiento de pacientes con CCRm que no habían obtenido resultados satisfactorios con los regímenes basados en 5-FU, oxaliplatino e irinotecan, bevacizumab, panitumumab o cetuximab. Dicha aprobación se basó en un estudio internacional aleatorio en el que los pacientes habían recibido previamente terapias basadas en 5-FU, oxaliplatino e irinotecan o bevacizumab. Un solo paciente había recibido panitumumab o cetuximab. En todos los casos, se observó un aumento de la SG en el grupo que recibió regorafenib respecto al grupo placebo (Grothey et al., 2013).

**Aflibercept** es una proteína de fusión recombinante que inhibe el receptor VEGF. Fue aprobado en agosto del 2012 (Zaltrap<sup>®</sup>, Sanofi y Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) para ser usado en combinación con FOLFIRI (5-FU/leucovorina/irinotecan) para el tratamiento de pacientes con tumores resistentes a regímenes basados en oxaliplatino o pacientes en los cuales no se han observado mejoras tras el tratamiento (Van et al., 2012).



# INTRODUCCIÓN II



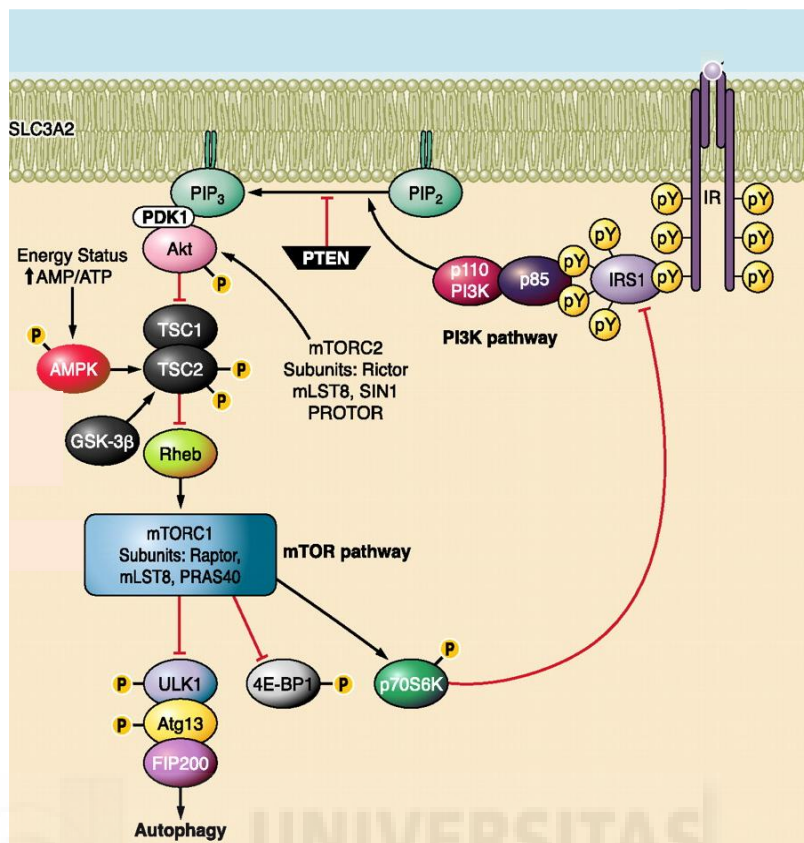
## **Moléculas diana de la terapia dirigida: Vías PI3K y RAF/MEK/ERK**

La mayoría de los compuestos utilizados en la terapia dirigida tienen como diana moléculas clave de las vías de señalización RAF/MEK/ERK o PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. Por tanto, para comprender el modo de acción de estos compuestos es imprescindible comprender el funcionamiento de estas vías de señalización así como las moléculas que forman parte de ellas. A continuación se describirá brevemente cada una de estas vías y las anomalías genéticas más relevantes en los genes que codifican para las proteínas que las componen.

### ***Vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/p70S6K***

La vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K o simplemente vía fosfatidilinositol 3-quinasa, PI3K (*PhosphoInositide 3-Kinase*) tiene un papel esencial en diversas funciones fisiológicas, como ciclo celular, supervivencia, síntesis de proteínas, motilidad y angiogénesis (Figura 4). Su activación es desencadenada por diversos estímulos que activan la enzima PI3K, un componente central de esta ruta.

Se han descrito tres clases de PI3K en base a su estructura y especificidad de sustrato: clase I, II y III. Hasta la fecha, la PI3K clase I, parece ser la única enzima involucrada en los procesos tumorales, aunque estudios recientes sugieren que la PI3K clase II también jugaría un papel en cáncer (Low et al., 2008). Esto se debe, en parte a que la PI3K clase I, es la única capaz de generar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate*), producto esencial para la oncogenicidad mediada por PI3K. Las PI3K de clases II y III sintetizan fosfatidilinositol monofosfato, PIP (*Phosphatidylinositol monophosphate*) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, PIP<sub>2</sub> (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) (Vanhaesebroeck et al., 1997) (Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999), que no parecen desempeñar un papel en cáncer (Denley et al., 2009). A continuación se describirán brevemente las características más importantes de cada clase de enzima y el funcionamiento de la ruta de señalización mediada por la PI3K clase I.



**Figura 4: Vía de la PI3K.** En la Figura se muestran las principales moléculas que forman parte de esta vía de señalización y que son citadas en el texto. Figura modificada de (Meric-Bernstam and Gonzalez-Angulo, 2009).

**La PI3K clase II** carece de subunidad reguladora y se encuentra formada por una de las tres subunidades catalíticas, PI3K-C2a, PI3K-C2b o PI3K-C2g, que son isoformas monoméricas asociadas a membrana (Falasca and Maffucci, 2007). Su activación está mediada por receptores con actividad tirosín quinasa, receptores de citoquinas e integrinas. Las tres isoformas reconocen el fosfatidilinositol, PI (*Phosphatidyl Inositol*) y el PIP como sustratos y sintetizan PIP y PIP<sub>2</sub>, respectivamente (Vogt et al., 2010). Sin embargo, no se conocen las funciones específicas de esta clase de enzima.

**La PI3K clase III** consiste de una única subunidad catalítica denominada Vps3. Dicha enzima está involucrada en procesos tales como el tráfico de membranas, proliferación celular y autofagia, lo que se discutirá en la sección III de la Introducción (Engelman et al., 2006).

**La PI3K clase I** se subdivide en la **clase Ia y Ib**

La **clase Ia** está formada por tres subunidades catalíticas, p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , que son isoformas codificadas por genes diferentes. Cada subunidad forma un heterodímero con una de las cinco subunidades reguladoras, p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p85 $\gamma$ , p50 $\alpha$  o p55 $\alpha$ . Las isoformas p110 $\alpha$  y p110 $\beta$  se expresan de forma ubicua en todos los tejidos y juegan un papel en la proliferación celular y señalización de insulina. La isoforma p110 $\delta$  se expresa principalmente en los leucocitos y desempeña un papel en inmunidad e inflamación (Maira et al., 2008b).

La **clase Ib** consiste de un solo miembro formado por la subunidad catalítica p110 $\delta$  y la subunidad reguladora p101 y es activada por receptores de membrana acoplados a la proteína G. La isoforma p110 $\delta$  se localiza principalmente en leucocitos, con lo que la presencia de la quinasa Ib se restringe a este tipo de células. Debido a que la quinasa Ia se distribuye de forma ubicua en el organismo, describiremos la vía en base a la activación de esta clase de enzima (Maira et al., 2008b).

**Activación de PI3K:** La enzima PI3K $\alpha$  (en adelante PI3K) es activada por receptores con actividad tirosín quinasa en respuesta a factores de crecimiento, como EGF (*Epidermal Growth Factor*), PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*). Los receptores activados estimulan directa o indirectamente (mediante proteínas adaptadoras) a la enzima PI3K que es reclutada a la membrana por interacción de la subunidad reguladora p85 con el receptor fosforilado (Maira et al., 2008b). La proteína Ras también es capaz de activar a la PI3K clase I (Domin and Waterfield, 1997). Una vez activada, la subunidad catalítica p110 cataliza la formación de PIP<sub>2</sub> y PIP<sub>3</sub>. La activación de la PI3K es inhibida por la proteína supresora de tumores PTEN que desfosforila PIP<sub>3</sub> y PIP<sub>2</sub>, evitando la activación de AKT y PDK1 (*Phosphoinositide Dependent Kinase 1*), entre otras proteínas.

**Activación de AKT por PIP<sub>3</sub>:** Una vez sintetizado, PIP<sub>3</sub> se une al dominio homólogo de pleckstrina (*Pleckstrin Homology, PH*) existente en múltiples proteínas y como consecuencia, éstas son traslocadas a la membrana celular donde son estimuladas. Dos proteínas efectoras clave con dominio PH son las quinasas AKT y PDK1. Existen tres isoformas de la proteína AKT, AKT1, AKT2 y AKT3 que se expresan en la mayor parte de los tejidos (Zinda et al., 2001). La activación completa de AKT1 requiere de la fosforilación consecutiva de dos aminoácidos, la treonina 308 (T308) y la serina 473 (S473). En un primer paso, la quinasa PDK1 fosforila la T308 y consecutivamente la S473 es fosforilada por PDK1, PDK2 y la propia AKT, entre otras.



La activación de AKT2 y AKT3 ocurre mediante un mecanismo similar y la fosforilación en residuos homólogos (Andjelkovic et al., 1997; Walker et al., 1998).

**Activación de mTOR.** AKT activa reconoce y fosforila la secuencia consenso RXXRXXS/TB donde X representa cualquier aminoácido y B representa residuos hidrofóbicos. Esta secuencia está presente en múltiples proteínas, por lo que se han identificado y validado numerosos sustratos de AKT, los cuales regulan diversos procesos celulares como la apoptosis, progresión del ciclo celular, transcripción de genes y traducción de proteínas (Obenauer et al., 2003). En este apartado, se centrará la atención en uno de sus sustratos, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), y en sus efectores más importantes, p70S6K y RPS6 por estar bien caracterizados y ser objeto de estudio de este trabajo.

El papel de AKT en el crecimiento celular (aumento de la masa en una célula) está mediado por la activación de la proteína **mTOR**, la cual regula procesos como la traducción de proteínas y biogénesis de los ribosomas (Wullschleger et al., 2006). mTOR se encuentra formando parte de dos complejos multiproteína, TORC1 (*Target Of Rapamycin Complex1*) y TORC2 (*Target Of Rapamycin Complex2*), que son regulados de forma diferente y presentan distintas funciones. En el complejo **TORC1**, mTOR está unida a la proteína Raptor, LST8 y PRAS40 (Kim et al., 2002). En el complejo **TORC2**, mTOR está unida a la proteína Rictor, LST8 y SIN1 (Sarbasov et al., 2004). A diferencia de TORC1, que está bien caracterizado, no se conoce el mecanismo preciso de regulación y función de TORC2. Sin embargo, se ha descrito que su activación requiere de un complejo TSC (*Tuberous Sclerosis Complex*) activo no fosforilado (Huang and Manning, 2009). Se han identificado algunos sustratos de TORC2, entre los cuales se encuentra AKT (Huang et al., 2009). TORC2 es capaz de fosforilar AKT en S473, ocurriendo una retroalimentación positiva en la vía de señalización (Sarbasov et al., 2005). A continuación se describirá el mecanismo de activación de TORC1.

**Activación del complejo TORC1:** Existen dos mecanismos de activación de TORC1, la activación mediada por AKT y la activación independiente de AKT. **La activación mediada por AKT** involucra la acción de un complejo proteico formado por TSC1 (o hamartina) y TSC2 (o tuberina) y la proteína Rheb. La proteína Rheb activa estimula a TORC1. Cuando la vía está inactiva las proteínas TSC1 y TSC2 forman un complejo que presenta actividad GTPasa, induciendo la hidrólisis de GTP en la proteína Rheb, con lo que Rheb adquiere su conformación Rheb-GDP inactiva incapaz de activar a TORC1. Cuando la vía se estimula (por la presencia de

nutrientes, etc.), la fosforilación de TSC2 mediada por AKT inhibe a TSC2 quien se disocia de TSC1 y el complejo pierde su actividad GTPasa, con lo que ya no hidroliza el GTP en la proteína Rheb. Como consecuencia, Rheb se mantiene en su conformación activa (unida a GTP) y estimula a TORC1. En resumen, AKT activa a TORC1 indirectamente mediante la inhibición de TSC2, lo que permite que Rheb se accione (adquiera su conformación Rheb-GTP) y estimule a TORC1. Existe además otro mecanismo mediante el cual TORC1 puede ser activado por AKT que involucra a la proteína PRAS40. AKT es capaz de fosforilar directamente la proteína PRAS40 (Kovacina et al., 2003) y dicha fosforilación evita la inhibición de TORC1 por PRAS40, estimulándose el complejo TORC1.

La **activación de TORC1 independiente de AKT** ha sido recientemente caracterizada y también involucra al complejo TSC. En este caso, TSC funciona directamente como un sensor e integrador de señales. Así, estímulos como la deprivación de energía, la hipoxia o la falta de factores de crecimiento activan a TSC2 e inhiben TORC1. Por ejemplo, cuando ocurre un aumento en los niveles de AMP (indicativo de falta de energía), se activa la enzima AMPK, la cual activa a TSC2 y se inhibe TORC1 (Vogt and Hart, 2011).

**Activación de quinasa S6K1 por mTOR:** Una vez activado, TORC1 estimula varios sustratos. Uno de ellos, la proteína efectora S6 quinasa1 (*S6 Kinase1*, S6K1), está bien caracterizado y ha sido sujeto de estudio en este trabajo. Esta proteína presenta dos isoformas, p70S6K1 y p85S6K1 que están codificadas por el mismo gen y se generan por “splicing” alternativo en el extremo N-terminal de la proteína. Más específicamente, las isoformas se generan por sitios de iniciación de la traducción alternativos en el mismo transcrito (Pullen and Thomas, 1997). La isoforma p70S6K se localiza en el citosol mientras que la p85S6K es nuclear (Reinhard et al., 1992). Ambas proteínas presentan un mecanismo de regulación similar pero difieren en un segmento de 23 aminoácidos en el extremo N-terminal, responsable de la localización de la isoforma p85 en el núcleo (Reinhard et al., 1994). La activación de la enzima p70S6K es compleja e involucra varios eventos de fosforilación que ocurren de manera jerárquica. La fosforilación en el residuo de treonina 389 (T389) parece ser fundamental para la activación de la enzima (Chan et al., 1999). Estudios recientes han mostrado que p70S6K no solo es regulada por la ruta de PI3K sino también por la vía RAF/MEK/ERK (Martelli et al., 2010).

**Activación de RPS6 por S6K1:** Durante más de una década se pensaba que el único sustrato de S6K1 era la proteína ribosomal RPS6 (*Ribosomal Protein S6*). Hoy en día se han

identificado un total de 13 sustratos, de los cuales 5 están involucrados en la maquinaria traduccional de la célula. Sin embargo, todavía no está claro el efecto de la fosforilación mediada por S6K1 en la actividad biológica de estos sustratos. RPS6 puede ser fosforilada en cinco sitios diferentes (S235, S236, S240, S244, S247) que se hallan agrupados en la proteína. La fosforilación de estos residuos parece ser secuencial y se ha propuesto que la S236 es el sitio de fosforilación primario (Flotow and Thomas, 1992).

### **Anomalías genéticas de la vía PI3K en cáncer**

Los tumores presentan, entre otras alteraciones, anomalías en los genes que codifican para las moléculas que forman parte de la vía PI3K y, como resultado, proliferan descontroladamente, presentan resistencia a apoptosis y una mayor capacidad metastásica, todos ellos eventos críticos en cáncer. Esta señalización aberrante puede ocurrir por mutaciones activadoras de genes, translocaciones, amplificaciones o deleciones genéticas. A continuación se describirán las anomalías genéticas más comunes en cáncer.

**Mutaciones en receptores de factores de crecimiento:** el gen *EGFR* se encuentra amplificado en algunos tipos de tumores, incluyendo tumores de colon (Al-Kuraya et al., 2007). En ocasiones, se han observado también mutaciones que conducen a una activación constitutiva del receptor (Arteaga, 2006). Otro receptor que se encuentra frecuentemente alterado en cáncer es HER2 (EGFR-2, ErbB2, c-neu). Aproximadamente el 25-30% de los tumores de mama invasivos y tumores de ovario presentan una sobreexpresión de este gen debido a amplificaciones o por desregulación transcripcional. Las mutaciones somáticas en este gen son un evento raro y se han observado en bajo porcentaje en adenocarcinoma de pulmón (10%) y en carcinoma de pulmón de célula no pequeña (NSCLC, *Non-Small-Cell Lung Carcinoma*) (4%) (Moasser, 2007).

**Mutaciones en la enzima PI3K:** se han descrito tres tipos anomalías en los genes que codifican para la enzima PI3K: mutaciones en el gen *PIK3CA*, mutaciones en el gen *PIK3R1* y amplificaciones en el gen *PIK3CA*.

Mutaciones en el gen *PIK3CA*: el gen *PIK3CA*, codifica para la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la enzima PI3K clase I. Este gen se encuentra mutado de forma frecuente en varios tipos de cáncer, como tumores de ovario, colon, mama, estómago, cerebro y tumores cervicales

(Broderick et al., 2004). En el caso del cáncer colorrectal la frecuencia de mutación en el gen *PIK3CA* es del 10-30%. Las mutaciones en el gen *PIK3CA* pueden ser clasificadas como mutaciones en puntos calientes (“*hot-spots*”) o mutaciones raras dependiendo de su frecuencia de aparición.

*Mutaciones en puntos calientes:* los puntos calientes son zonas definidas dentro del genoma que presentan una elevada frecuencia de mutación. Las mutaciones en el gen *PIK3CA* se concentran en tres puntos calientes a lo largo de la secuencia codificadora del gen (Samuels et al., 2004); dos de ellos se localizan en la zona que codifica para el dominio helicoidal de p110 $\alpha$ , mientras que el tercer punto se localiza en la zona que codifica para el dominio catalítico. Los tres tipos de mutaciones consisten en una sustitución de un solo nucleótido, lo que lleva a las siguientes sustituciones de aminoácidos: E542K, E545K y H1047R, las cuales confieren una actividad constitutiva a la enzima (Samuels et al., 2004; Samuels et al., 2005). La enzima mutada presenta una mayor actividad de conversión de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> respecto a la enzima salvaje (Ikenoue et al., 2005). Asimismo, en las células con la enzima mutada, la señalización es independiente de los factores de crecimiento; es constitutiva y está activada en ausencia de nutrientes. En modelos *in vivo*, la expresión transgénica del mutante p110 $\alpha$  produce malignidad (Bader et al., 2006). En resumen, las mutaciones en puntos calientes aumentan la actividad enzimática, inducen la señalización constitutiva de la vía PI3K y brindan capacidad oncogénica, por lo que se ha propuesto que estas mutaciones funcionan como “conductoras” (“*drivers*”) en cáncer, responsables de al menos una parte del fenotipo oncogénico de la célula cancerígena.

*Mutaciones poco frecuentes:* las mutaciones en puntos calientes constituyen el 80% de las mutaciones en el gen *PIK3CA*. El porcentaje restante se deben a mutaciones poco frecuentes que consisten en su gran mayoría en sustituciones en un solo nucleótido (Ikenoue et al., 2005). La mayor parte de estas mutaciones conducen a una ganancia de función de la célula tumoral (Gymnopoulos et al., 2007). Sin embargo, la ganancia de función es menor respecto a las mutaciones en puntos calientes ya que las células mutantes presentan una actividad enzimática menor, una activación constitutiva de la vía PI3K más débil y una transformación oncogénica menos marcada. Este hecho puede explicar por qué estas mutaciones son difíciles de encontrar en las células tumorales. Las mutaciones raras se distribuyen a lo largo de toda la secuencia codificadora de p110 $\alpha$ , lo que hizo pensar que cualquier mutación al azar podría inducir una ganancia de función, tal vez por producir un cambio conformacional en la enzima. Sin embargo, al introducir mutaciones al azar en el gen se vio que no se alteraba el fenotipo, con lo cual se

sugiere que cualquier mutación que se encuentra en la célula tumoral, no importa cuán rara sea, sería resultado de la selección positiva (Gymnopoulos et al., 2007).

Mutaciones en el gen *PIK3RI*: el gen *PIK3RI*, codifica para la subunidad p85 de la enzima PI3K clase I. A diferencia de las mutaciones en el gen *PIK3CA*, las mutaciones en el gen *PIK3RI* son menos frecuentes en tumores. Varios tipos de tumores, como tumores de ovario, colon y mama presentan mutaciones en el gen *PIK3RI* con una baja frecuencia (Philp et al., 2001). Las mutaciones en este gen también se encuentran agrupadas y la mayoría ocurren en un sitio limitado a seis residuos de aminoácidos que se localizan en el dominio inter-SH2 de la subunidad p85. Debido a que esta porción de la subunidad p85 es el punto de contacto con la subunidad p110 $\alpha$ , estas mutaciones parecen interferir con la unión de ambas subunidades (Park et al., 2010).

Amplificación en el gen *PIK3CA*: además de mutaciones puntuales se han identificado también amplificaciones en el gen *PIK3CA* con una elevada frecuencia en algunos tipos de tumores como tumores gástricos, carcinoma de pulmón, tumores de cabeza y cuello, tumores de ovario y carcinoma cervical uterino (Shayesteh et al., 1999; Byun et al., 2003).

**Mutaciones en *PTEN***: el gen *PTEN* se encuentra frecuentemente inactivado por mutación, delección o silenciamiento epigenético y es el gen supresor de tumores más comúnmente mutado después de *TP53* (Trotman and Pandolfi, 2003). La pérdida de función de PTEN conduce a un aumento de la síntesis de PIP<sub>3</sub> y como consecuencia se activan de forma aberrante múltiples proteínas. En el caso de CCR la frecuencia de esta mutación es del 9% ([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)).

**Mutaciones en *AKT***: se han identificado amplificaciones del gen *AKT1* en tumores de adenocarcinoma gástrico (Staal, 1987) y amplificaciones en el gen *AKT2* en tumores de ovarios, mama y páncreas (Bellacosa et al., 1995; Cheng et al., 1996). La mutación en el gen *AKT* es un evento raro. Sin embargo, se han descrito mutaciones somáticas en el dominio PH de *AKT1* en un bajo porcentaje de tumores de mama, ovario y colon. Dicha mutación produce una alteración electrostática en el dominio PH que lleva a una unión más fuerte de AKT al PIP<sub>3</sub> de membrana y como consecuencia la vía se activa de manera aberrante. En el caso de CCR, se ha identificado dicha mutación en el 6% de los tumores estudiados. Sin embargo se precisan estudios con un

mayor número de muestras para determinar la frecuencia de esta mutación en los distintos tipos de tumores (Carpten et al., 2007).

**Mutaciones en p70S6K:** el gen que codifica para las isoformas p70S6K y p85S6K, *RPS6KB1* se halla amplificado en algunos tipos de tumores como tumores de mama y algunos tipos de linfoma (Perez-Tenorio et al., 2011; Zhao et al., 2013). Además se han encontrado elevados niveles de ARNm en el 41% de los tumores (Wu et al., 2000; Barlund et al., 2000).

### **Terapia dirigida a la vía de señalización PI3K**

Las proteínas que componen la vía PI3K son dianas atractivas en la terapia dirigida ya que la gran mayoría se encuentran activadas de forma aberrante en muchos tipos de tumores. Si bien se han desarrollado infinidad de inhibidores de esta vía, mencionaremos solamente aquellos que se han utilizado en este estudio; los compuestos NVP-BEZ235 y PF-4708671.

**NVP-BEZ235 (BEZ)** es una imidazoquinazolina desarrollada por Novartis, que inhibe las enzimas PI3K y mTOR mediante su unión al sitio de unión al ATP. Dicho inhibidor presenta valores diferentes de  $IC_{50}$  (*half maximal Inhibitory Concentration*) para cada isoforma de PI3K. El valor de  $IC_{50}$  es una medida de la eficiencia de un determinado compuesto para inhibir una función biológica o bioquímica, más específicamente que cantidad de droga o compuesto es necesario para inhibir un proceso biológico o un componente de determinado proceso biológico (enzima, célula, etc) en un 50%. En este caso, la  $IC_{50}$  se define como la cantidad de BEZ necesario para inhibir la actividad de la enzima PI3K en un 50% y presenta un valor de 4nM para la isoforma p110 $\alpha$  de la enzima, 75nM para p110 $\beta$ , 7nM para p110 $\delta$  y 5nM para p110 $\gamma$ . Por otra parte, el valor de  $IC_{50}$  para mTOR es de 20,7 nM (Maira et al., 2008a). BEZ presenta actividad antitumoral en líneas celulares tumorales humanas y modelos de animales. En el caso de modelos *in vivo* BEZ ha presentado una elevada tolerancia respecto a los animales control y no se observó una diferencia importante en el peso del animal (Maira et al., 2008a; Engelman et al., 2008).

El gran problema de los inhibidores de PI3K es su efecto en la homeostasis normal de las células, ya que se ha visto que la isoforma p110 tiene un importante papel en el metabolismo normal de glucosa. Sin embargo, a diferencia de otro tipo de inhibidores, no se observaron alteraciones importantes en los niveles de glucosa e insulina en los animales tratados con BEZ en



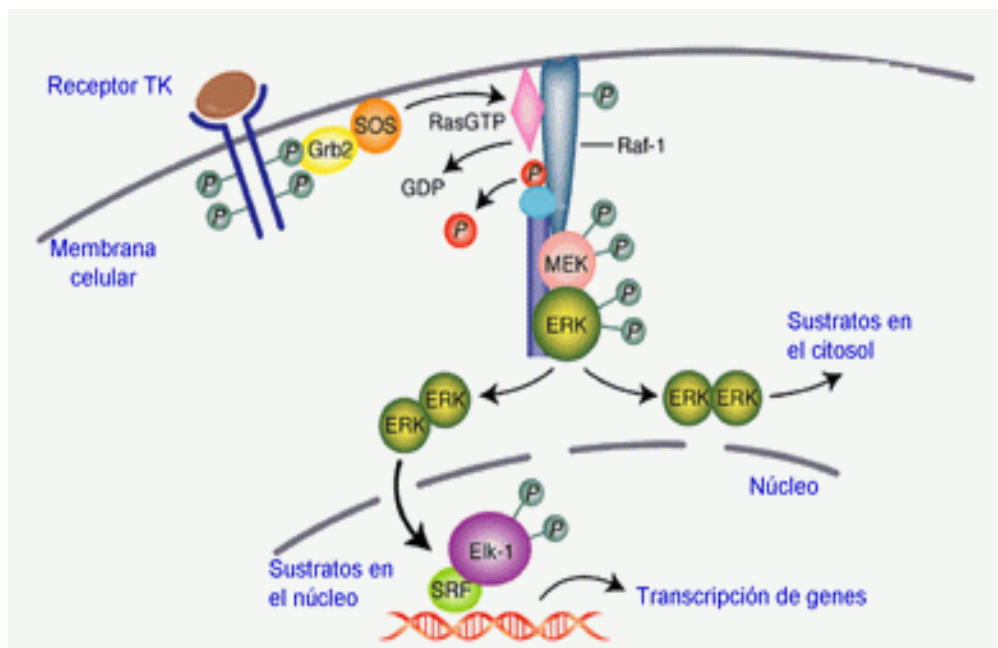
experimentos *in vivo* a corto y largo plazo (Maira et al., 2008a), lo que indica que el uso de BEZ no alteraría significativamente el metabolismo de la glucosa en las células normales, algo importante desde el punto de vista clínico.

**PF-4708671**, es el único inhibidor específico de la isoforma p70S6K existente hasta la fecha con una  $K_i$  de 20 nM y una  $IC_{50}$  de 160 nM. La  $K_i$  es una constante de inhibición absoluta y su valor se obtiene a partir del valor de  $IC_{50}$  utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff. PF-4708671 inhibe la fosforilación de RPS6 mediada por p70S6K en respuesta al factor de crecimiento insulínico 1, IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) (Pearce et al., 2010).

### ***Vía de señalización RAF/MEK/ERK***

La vía de señalización MAPK o RAF/MEK/ERK es otra ruta de gran importancia en cáncer que regula múltiples procesos tales como la proliferación celular, apoptosis y diferenciación celular (Figura 5). Recientemente, dicha vía también se ha visto involucrada en procesos de envejecimiento y senescencia. Esta ruta acopla señales desde la superficie celular hacia varios factores de transcripción, regulándose así la expresión de muchos genes. A continuación se describirá su funcionamiento y las principales anomalías genéticas relevantes en cáncer de las proteínas que forman parte de ella.

**Activación de Ras:** la cascada de señalización RAF/MEK/ERK se dispara con la estimulación de la proteína Ras (Figura 5). La unión de factores de crecimiento, citoquinas y mitógenos a sus receptores en la superficie celular lleva a la activación del complejo proteico Shc/Grb2/SOS quien induce el intercambio de GDP por GTP en la proteína Ras activándola. (Downward, 2003a). Además, para que Ras pueda reclutarse en la membrana debe sufrir un proceso de farnesilación mediado por la enzima farnesil transferasa o un proceso de geranilgeranilación mediado por la enzima geranilgeranil transferasa (McCubrey et al., 2007). Existen tres miembros de la familia Ras: Ha-Ras (Harvey-Ras), N-Ras, K-Ras (Kirsten-Ras) (Downward, 2003a). Las tres proteínas son capaces de activar la ruta RAF/MEK/ERK así como también la vía PI3K.



**Figura 5: Vía RAF/MEK/ERK.** En la Figura se muestran las principales moléculas que forman parte de esta ruta de señalización y que son citadas en el texto (Figura modificada de Expert Reviews in Molecular Medicine, 2002)

**Activación de RAF:** Existen tres genes *RAF* en humanos: *ARAF*, *BRAF* y *CRAF* (*RAF-1*), que codifican proteínas diferentes con funciones comunes y diversas. La activación de RAF es compleja e involucra varios procesos como su reclutamiento a la membrana mediado por Ras (Yan et al., 1998), su dimerización (Luo et al., 1996), su fosforilación y desfosforilación (Fabian et al., 1993), la disociación de la proteína inhibitoria de RAF (*RAF Kinase Inhibitory Protein, RKIP*) (Yeung et al., 1999; Dhillon et al., 2002) y su asociación con otros complejos proteicos (Blalock et al., 1999). Existen al menos trece sitios regulatorios de fosforilación en RAF-1 (Steelman et al., 2004). Cuando RAF-1 está inactivo, tres de estos sitios se encuentran fosforilados, lo que le permite unirse a la proteína 13-3-3 y permanecer en su configuración inactiva. Cuando se activa la vía, uno de estos sitios se desfosforila y la proteína 14-3-3 se disocia de RAF-1, lo que conduce a la fosforilación en otros sitios y a la estimulación de RAF. Dos de estos sitios, Y340 e Y341, están bien caracterizados y son fosforilados por la familia de quinasas Src. La activación de A-RAF ocurre mediante un mecanismo similar en residuos homólogos. Sin embargo, la activación de B-RAF ocurre de manera independiente de Src, debido a que los residuos Y340 e Y341 se reemplazan por ácido aspártico (Marais et al., 1997).

**Activación de MEK:** los tres miembros de RAF son capaces de activar a MEK1/2 con distinta intensidad siendo B-RAF su activador más potente (Alessi et al., 1994). Un aspecto



interesante de MEK1/2 es que dichas proteínas tienen a ERK1/2 como diana prioritaria, con lo que la inhibición terapéutica de MEK1/2 es relativamente específica.

**Activación y sustratos de ERK1/2:** ERK1 y ERK2 son activadas por fosforilación mediada por MEK1 y MEK2 en residuos específicos (Steelman et al., 2011; Lefloch et al., 2009). Se han identificado más de 600 sustratos de ERK1/2, entre los cuales se encuentran varios factores de transcripción. ERK1/2 es capaz de fosforilar y activar múltiples sustratos en el citosol, así como también entrar al núcleo y fosforilar y activar diversos factores de transcripción. Debido a la gran diversidad de sustratos de ERK1/2, estas proteínas están involucradas en procesos como proliferación celular y apoptosis, entre otros (McCubrey et al., 2009).

### **Anomalías genéticas de la vía RAF/MEK/ERK**

**Mutaciones en RAS:** Aproximadamente el 20-30% de todos los tipos de cáncer presentan mutaciones en el gen *RAS*. De ellas, el mayor porcentaje corresponden a mutaciones en el gen *KRAS* (85%), seguido de *NRAS* (15%) y *HRAS* ( $\leq 1\%$ ). En el caso de cáncer de colorrectal se ha reportado una frecuencia de aproximadamente 45% del gen *KRAS* (Downward, 2003b). El gen *RAS* puede ser activado por varios tipos de anomalías genéticas, como mutaciones puntuales, amplificaciones en el gen o sobreexpresión, quizá debida a un patrón de metilación alterado en la región promotora del gen (Steelman et al., 2011). La mutación en este gen conduce a una mayor actividad de la enzima PI3K (Shaw and Cantley, 2006; Rodriguez-Viciana et al., 1994).

**Mutaciones en RAF:** de los tres tipos de genes de RAF existentes en humanos (*ARAF*, *BRAF* y *CRAF*) solo *BRAF* parece estar mutado de forma frecuente en cáncer. En el caso de cáncer de colorrectal la frecuencia de mutación en *BRAF* es de aproximadamente el 10%. El tipo de mutación más frecuente en *BRAF* consiste en una mutación puntual que produce una sustitución de una Valina a Glutamato en el aminoácido 600, denominada mutación *V600E*.

**Mutaciones en MEK:** Inicialmente, no se pensaba que MEK fuera un gen que estuviese mutado de forma frecuente en cáncer. Sin embargo, estudios recientes han reportado que MEK1 y MEK2 se encuentran mutados en algunos tipos de tumores como cáncer de ovario, pulmón y colon (Pao and Girard, 2011). Asimismo, se ha observado que las mutaciones en MEK1 son determinantes de la sensibilidad/resistencia de algunos tipos de tumores a inhibidores de MEK y

RAF. También se ha considerado que las mutaciones en MEK1 podrían funcionar como mutaciones “conductoras” en cáncer (Pao and Girard, 2011).

### **Entrecruzamiento entre las vías PI3K y RAF/MEK/ERK**

Además de la gran complejidad en la señalización de las vías PI3K y RAF/MEK/ERK, en varias ocasiones se ha demostrado que existe entrecruzamiento en varios puntos de las vías. Por ejemplo, Ras activo es capaz de activar tanto la vía PI3K (por su unión a p110) como la vía RAF/MEK/ERK (Castellano and Downward, 2010). Por otra parte, ERK es capaz de inhibir a TSC2 en la ruta de la PI3K. TSC2 inactivo se disocia de TSC1, el complejo pierde su actividad GTPasa, Rheb se activa (por unión a GTP) y activa a TORC1 (Ma et al., 2005).

### **Razones para inhibir las vías PI3K y RAF/MEK/ERK en cáncer**

La razón fundamental para inhibir las vías PI3K y RAF/MEK/ERK en cáncer se debe a la activación anormal de moléculas críticas que componen estas vías. Si bien las células tumorales contienen múltiples anomalías genéticas y epigenéticas, parecen depender solamente de uno o unos pocos genes para la manutención del fenotipo maligno y supervivencia, lo que se ha denominado “adicción a oncogenes”. Estos genes son responsables, en parte, de la activación aberrante de proteínas de las vías PI3K y RAF/MEK/ERK. Así, la inhibición farmacológica de estas proteínas constituye una estrategia terapéutica para inducir la muerte del tumor o bloquear su proliferación. En ocasiones, una inhibición parcial de la ruta es suficiente para inhibir el crecimiento de un tumor sin afectar significativamente la proliferación de las células normales. (Weinstein, 2002; Weinstein and Joe, 2006).

Otra razón importante por la que se han realizado esfuerzos en el desarrollo de inhibidores de las rutas PI3K y RAF/MEK/ERK, es que la mayoría de los componentes de estas vías son quinasas, con lo cual son ideales para el desarrollo de pequeñas moléculas inhibidoras.

### **Efectos tóxicos de los agentes “dirigidos” a las vías PI3K y RAF/MEK/ERK**

Si bien el desarrollo de agentes “dirigidos” ha brindado grandes beneficios a los pacientes con cáncer, un factor a tener en cuenta es la toxicidad que puede causar a las células normales. En general se plantea que si un tumor es “adicto” a determinada vía de señalización, la inhibición

de esta vía será más selectiva para las células tumorales y afectará en menor grado a las células normales. Sin embargo, en muchas ocasiones se observan efectos colaterales adversos importantes.

Por ejemplo, se ha descrito que la isoforma p110 $\alpha$  de la PI3K tiene un papel importante en el metabolismo normal de la glucosa. En un estudio en el que se inhibe la enzima PI3K, la inhibición de la subunidad p110 $\alpha$  altera el metabolismo de la glucosa de las células (Foukas et al., 2006). Se ha observado también que la enzima PI3K juega un papel en la regulación de las células madre hematopoyéticas, lo que sugiere que una inhibición crónica de esta vía podría conducir a una insuficiencia hematológica a largo plazo (Zhang et al., 2006). En el futuro, el desarrollo de inhibidores específicos para determinadas isoformas de una proteína, tales como PI3K o AKT podrán combatir los efectos tóxicos de determinados agentes y maximizar su eficacia.

### **Necesidad de biomarcadores en el desarrollo de los agentes quimioterapéuticos**

El desarrollo de nuevos fármacos es un proceso lento, costoso y muchas veces ineficiente, ya que solo un pequeño porcentaje de los fármacos son aprobados para su uso en la clínica (Sarker and Workman, 2007). Esto se debe, en parte, a que los tumores presentan heterogeneidad intertumoral o intratumoral y poseen anomalías genéticas muy diferentes, por lo que responden de manera muy variable a los tratamientos (Thomas, 2006). Un punto importante en el proceso de desarrollo de un fármaco antitumoral consiste en llevar a cabo estudios paralelos que intenten identificar biomarcadores de respuesta eficaces. Cuando se desarrolla un nuevo inhibidor, además de ser evaluado en base a su toxicidad, solubilidad y otros factores farmacodinámicos, se debe evaluar también su efecto sobre la actividad de sus proteínas efectoras en la vía de señalización. Esto permitirá seleccionar aquellos pacientes que respondan mejor al tratamiento e identificar aquellos en los que el tratamiento no será beneficioso para poder brindarles terapias alternativas.

Existen varios ejemplos donde la identificación de marcadores de respuesta ha permitido optimizar el uso de un nuevo agente quimioterapéutico y acelerar su desarrollo. Por ejemplo, trastuzumab, es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER-2. Dicho inhibidor ha resultado ser muy eficaz en tumores de mama que presentaban amplificación en el gen HER-2 (Slamon et al., 2001). En este caso, el desarrollo coordinado de dicho inhibidor con métodos que

identificaban a los pacientes que presentaban tumores con el gen amplificado, candidatos de beneficiarse de esta terapia, permitió su incorporación eficiente en la práctica clínica. Si los ensayos preclínicos y clínicos previos no se hubiesen restringido a los pacientes con elevados niveles de expresión de HER-2, quizá se hubiese desvalorizado el uso de este inhibidor y retrasado su aprobación o incluso no hubiese sido aprobado para su uso en la clínica.

Otro ejemplo claro es el caso de los inhibidores de receptores tirosín quinasa, como Herceptin (inhibe el receptor HER-2), Gleevec (inhibe Bcr-Abl y el receptor PDGFR, entre otros) o Gefitinib (inhibe el receptor EGFR). La eficacia de estos inhibidores puede verse comprometida por la existencia de mutaciones activadoras en genes que codifican para proteínas que se encuentran por debajo de los receptores en la vía de señalización, como p110 y AKT, entre otros. También se ha observado que las células tumorales que presentan una pérdida o inactivación de la proteína PTEN (regulador negativo de la vía PI3K) son resistentes a Gefitinib (Bianco et al., 2003).

Otro ejemplo lo constituyen los inhibidores de receptor EGFR, Cetuximab y Panitumumab, que son utilizados actualmente para el tratamiento de CCRm. En este caso, existen dos biomarcadores de respuesta a estos inhibidores, las mutaciones en *KRAS* y *BRAF*. El 40% de los pacientes con CCR presentan **mutación en el gen *KRAS*** y como resultado tienen la vía RAS/RAF/MEK activada de forma constitutiva, independientemente del estado de activación de EGFR. Ensayos clínicos han demostrado que la mutación en *KRAS* es un predictor negativo de respuesta a Cetuximab y Panitumumab. Cuando un paciente presenta CCRm, se evalúa el estado de *KRAS* y sólo los pacientes con *KRAS* nativo son tratados con terapias anti-EGFR (Allegra et al., 2009). Las **mutaciones en el gen *BRAF***, también constituyen un marcador de respuesta a terapias anti-EGFR. *BRAF* se encuentra mutado en el 10% de los pacientes con CCR y se ha observado que las mutaciones en *BRAF* y *KRAS* son mutuamente excluyentes (Fransen et al., 2004). Los pacientes con mutaciones en *BRAF* no responden al tratamiento con fármacos anti-EGFR y los pacientes con *KRAS* y *BRAF* nativo tiene una supervivencia mayor que los pacientes con mutación en *BRAF*. Sin embargo, debido al pequeño porcentaje de pacientes que presentan esta mutación (10%), es difícil utilizarlo como marcador predictivo de respuesta.

Si bien se han identificado algunos marcadores de respuesta eficaces a determinados tratamientos, existen casos en los que se han observado respuestas anómalas sin hallarse una justificación. Por ejemplo, estudios clínicos muestran que no existe correlación entre los niveles

de expresión de EGFR y la respuesta a Cetuximab y Panitumumab (Saltz et al., 2004). Asimismo, pacientes cuyos tumores no expresan EGFR han respondido eficazmente al tratamiento con terapias anti-EGFR (Chung et al., 2005). Además, las mutaciones activadoras del gen EGFR son poco frecuentes en pacientes con CCR (Barber et al., 2004). Estos resultados muestran la necesidad de identificar nuevos marcadores de respuesta que permitan aplicar las terapias adecuadas para cada paciente.

Todos estos ejemplos han esclarecido un importante paradigma en el desarrollo de las terapias aplicadas: es necesario coordinar la validación de la diana y el desarrollo de un inhibidor con la implementación de marcadores moleculares de respuesta.

### **AZD6244 como nueva terapia dirigida en CCR**

El estado mutacional de *KRAS* y *BRAF* son útiles como marcadores predictivos de respuesta a inhibidores de EGFR en pacientes con CCR. Sin embargo presentan sus limitaciones ya que sólo el 40% y 10% de los pacientes con CCR presentan mutaciones en *KRAS* y *BRAF*, respectivamente. Se deben centrar esfuerzos en desarrollar nuevos fármacos que sean efectivos e identificar marcadores de respuesta eficaces que permitan optimizar su uso en los pacientes con cáncer colorrectal.

El fármaco AZD6244 (en adelante AZD), un inhibidor de segunda generación desarrollado recientemente por Astra-Zeneca, ha demostrado un gran potencial para el tratamiento de varios tipos de tumores, incluyendo el cáncer de colon (Shannon et al., 2009). Se trata de un inhibidor altamente selectivo de MEK1 y MEK2. Este inhibidor, a diferencia de muchos otros, no se une al sitio de unión al ATP de la enzima, sino a un sitio específico de unión del inhibidor, lo que le confiere gran especificidad de acción (Yeh et al., 2007). Dicho compuesto ha resultado muy eficaz en modelos preclínicos y está siendo evaluado clínicamente en la actualidad. Por ejemplo, se están llevando a cabo ensayos clínicos multicéntricos de fase II en los que se compara AZD con capecitabina oral como segunda o tercera línea de tratamiento en pacientes con CCRm. En este estudio, AZD presenta una tolerancia elevada en los pacientes y una eficacia similar a la capecitabina ya que la PLE (progresión libre de enfermedad) no es muy diferente (Bennouna et al., 2011).

Si bien dicho fármaco parece tener un gran potencial para su aplicación en quimioterapia, en varios tipos de tumores, incluso en cáncer de colon, no existen en la actualidad marcadores eficaces de respuesta a este agente. Existen en la literatura escasos trabajos realizados a nivel preclínico que sugieren que líneas celulares resistentes a AZD presentan activación de la vía PI3K (Hoeflich et al., 2009; Meng et al., 2009).



# **INTRODUCCIÓN III**



La tercera sección de los resultados de este trabajo de tesis investiga dos procesos celulares de gran importancia, la muerte celular por apoptosis y la autofagia. A continuación describiremos brevemente cada uno de estos procesos.

### **Muerte celular por apoptosis**

El término apoptosis fue introducido por Kerr y colaboradores en el año 1972 y proviene del término en griego “appo-teo-sis” que significa “caída” (de manera similar a como caen las hojas de los árboles (Kerr et al., 1972). Este término ha sido utilizado como sinónimo de muerte celular programada durante mucho tiempo. Sin embargo, en los últimos años se han descrito diversos mecanismos de muerte programada diferentes de la apoptosis, por lo que el Comité de Nomenclatura sobre muerte celular (*Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD*) recomienda ser cauto en el uso de este término (Kroemer et al., 2009).

Históricamente, los tipos de muerte se clasificaban en base a criterios morfológicos. En función de estos criterios, la apoptosis era clasificada como muerte celular programada de tipo I y la autofagia como muerte celular programada de tipo II. Por su parte, la necrosis se definía como un tipo de muerte que no presentaba ninguna de las características de apoptosis ni autofagia. Sin embargo, en las últimas décadas, debido a los avances en los métodos bioquímicos, los diferentes tipos de muerte se han reclasificado en base no solo a características morfológicas sino también a características bioquímicas, criterios funcionales y aspectos inmunológicos. Basado en ello, la NCCD ha clasificado los distintos tipos de muerte en dos grandes grupos: la muerte celular programada y no programada, donde básicamente los únicos procesos de muerte celular no programada serían la necrosis y la ontosis. De acuerdo a esta clasificación, la apoptosis se define como un mecanismo de muerte celular programada caspasa-dependiente, junto con otros procesos como la cornificación, piroptosis y anoikis, en los cuales también participan las caspasas.

Si bien la apoptosis se define como un tipo de muerte programada dependiente de caspasas, existen otros tipos de muerte independientes de caspasas (catástrofe mitótica, autofagia, necroptosis, entosis, netosis y parthanatos) que presentan las mismas características morfológicas que la apoptosis como son, la pérdida de la simetría de membrana y el contacto célula-célula, la condensación de la cromatina y fragmentación del núcleo, reducción celular, formación de



protrusiones de membrana (“*membrane blebbing*”) y formación de cuerpos apoptóticos (Wyllie et al., 1980).

Además de los cambios morfológicos arriba mencionados, las células apoptóticas también sufren una serie de alteraciones bioquímicas como la activación de endonucleasas (digieren el ADN), la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la traslocación del fosfolípido fosfatidil serina desde la membrana interna a la externa de la célula, lo que permite la detección de las células por los fagocitos para su posterior eliminación (Zamzami et al., 1995; Martin et al., 1995).

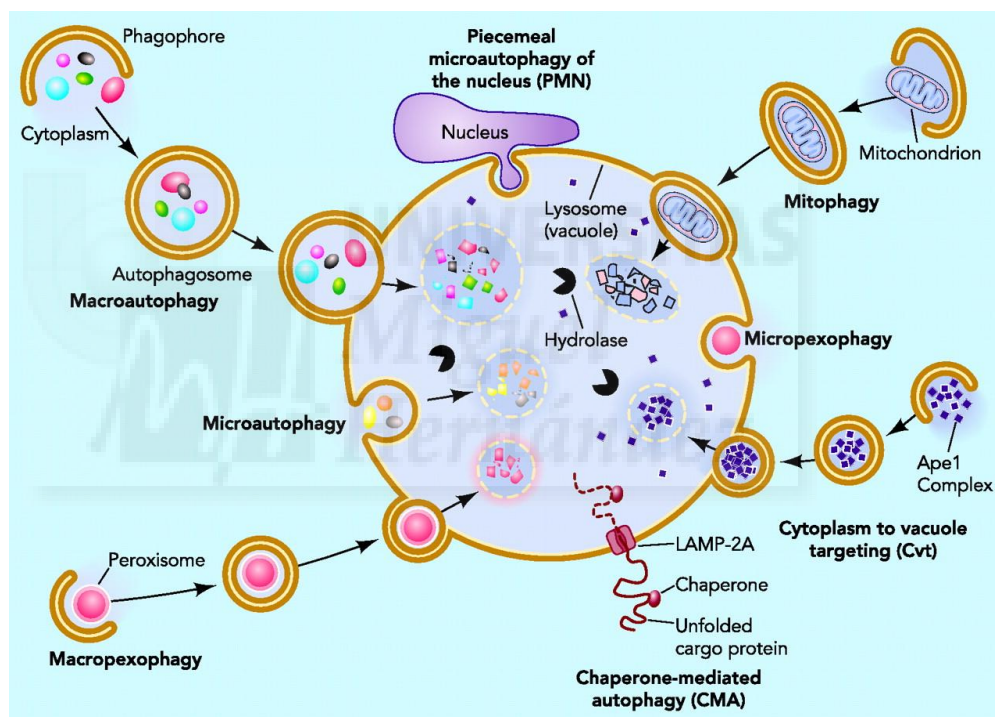
La muerte por apoptosis comprende dos rutas bien diferenciadas: la vía extrínseca o la vía intrínseca o mitocondrial. La vía extrínseca tiene un papel importante en la homeostasis de los tejidos y responde a estímulos externos que provienen especialmente del sistema inmune. Por su parte, la vía intrínseca es activada en respuesta a estímulos internos como daño en el ADN, elevados niveles de calcio citosólico, privación de nutrientes, estrés oxidativo, radiación, agentes citotóxicos, etc. Una de las principales características de esta vía consiste en la desestabilización de las mitocondrias (Danial and Korsmeyer, 2004; Meier and Vousden, 2007).

### **El proceso de autofagia**

La autofagia es un proceso fisiológico de autodigestión que ocurre en todas las células eucariotas y consiste en la degradación mediada por los lisosomas, de orgánulos y proteínas de vida media larga para mantener la homeostasis de la células (Klionsky, 2007). Hasta la fecha, se han descrito tres vías de autofagia diferentes: **macroautofagia** (normalmente llamada autofagia), **microautofagia** y **autofagia mediada por chaperonas (AMC)**. Los tres tipos difieren en la forma como es entregada la carga a los lisosomas (Figura 6).

La **macroautofagia** es un proceso dinámico en el que porciones del citosol y orgánulos son secuestrados en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma que se fusiona con el lisosoma (Nakatogawa et al., 2009; Tanida et al., 2004b). La **microautofagia** consiste en el secuestro de porciones del citoplasma mediada por el lisosoma. Durante este proceso, se produce una invaginación en la membrana lisosomal, la cual posteriormente se suelta para formar una vacuola interna que contiene material proveniente del citoplasma (Mijaljica et al., 2011). Tanto

la macro como la microautofagia son vías de degradación no selectivas en las que porciones del citoplasma son secuestradas al azar. Sin embargo, existen algunos casos donde la autofagia puede eliminar de forma selectiva algunos orgánulos, tales como peroxisomas, mitocondrias o retículo endoplásmico (RE). Por el contrario, la **AMC** no involucra tráfico vesicular y es específica para la degradación de proteínas. Durante este proceso, las proteínas son liberadas en los lisosomas mediante el auxilio de chaperonas moleculares y un receptor en la superficie del lisosoma. Las proteínas citosólicas que contienen una secuencia peptídica específica (motivo KFERQ) son reconocidas por un complejo de chaperonas moleculares (Hsc70) y posteriormente se unen a un receptor lisosomal denominado proteína de membrana asociado a lisosoma del tipo 2a, LAMP (Lysosome Associated Membrane Protein, LAMP type 2a (Majeski and Dice, 2004).



**Figura 6: Tipos de autofagia.** La Figura muestra los diferentes formas de autofagia existentes (Figura extraída de Yen and Klionsky, 2008).

La macroautofagia (en adelante autofagia), es la forma más prevalente y mejor caracterizada de autofagia en las células. El proceso comienza con la formación de una estructura de doble membrana en forma de “C” en el citosol, denominada “omegasoma”, la cual se forma a partir del RE (fase de iniciación). A continuación, el omegasoma crece formando la “membrana de aislamiento”, la cual se alarga y redondea englobando así componentes del citoplasma (fase de elongación). Posteriormente, la “membrana de aislamiento” se continua redondeando y acaba sellándose para formar una vacuola denominada “autofosoma” (fase de maduración), que

contiene porciones del citoplasma y algunos orgánulos. Finalmente, la membrana externa del autofosoma se fusiona con la membrana del lisosoma y la membrana interna (cuerpo autofágico) conteniendo los componentes citoplasmáticos son incorporados al lisosoma. El cuerpo autofágico es degradado por hidrolasas y los aminoácidos libres y macromoléculas resultantes son transportadas nuevamente al citosol para su reutilización (Tanida, 2011). De esta forma, la autofagia contribuye a la manutención de la homeostasis energética de la células, a la eliminación de orgánulos dañados y a la adaptación al estrés ambiental (Yen and Klionsky, 2008). Como consecuencia, los defectos en el mecanismo de autofagia se han asociado a varios tipos de patologías humanas incluyendo el cáncer.

### **i) Autofagia y cáncer**

La idea de que la autofagia podría tener un papel en cáncer surgió de la observación de que diversas proteínas supresoras de tumores eran capaces de inducir autofagia en las células. Asimismo, se ha descrito que varias proteínas oncogénicas inhiben la autofagia. En el siguiente apartado resumiremos los datos existentes en la literatura sobre el papel de proteínas supresoras de tumores y proteínas oncogénicas en la regulación de la autofagia.

#### **Los genes supresores de tumores inducen la autofagia**

Varias proteínas supresoras de tumores son capaces de regular la autofagia, como Beclina 1, UVRAG, PTEN, Bcl-2 y p53. A excepción de p53 que puede activar o inhibir este proceso, todas las demás inducen la autofagia.

**Beclina 1** es un activador crítico de la autofagia que actúa mediante su unión a la enzima PI3K de clase III y a otras proteínas formando complejos Beclina-PI3KIII únicos. El núcleo Beclina-PI3KIII (Fimia et al., 2007; Liang et al., 2006) fosforila el fosfatidil inositol (*PI, phosphatidyl inositol*) para sintetizar PIP, el cual presumiblemente permite el reclutamiento a la membrana de proteínas relacionadas con autofagia (proteínas Atg). En mamíferos existen al menos tres tipos diferentes de complejos Beclina-PI3KIII que contribuyen a la autofagia (Tanida, 2011; Mehrpour et al., 2010; Ku et al., 2008).

El primer vínculo entre autofagia y cáncer se estableció en el año 1999, cuando Liang y colaboradores descubrieron que Beclina 1 era capaz de inhibir la tumorigénesis (Liang et al.,

1999). Beclina 1 es un gen supresor de tumores (Yue et al., 2003; Qu et al., 2003) que está inactivado en varios tipos de cáncer incluyendo ovario, mama y próstata. Diversos estudios sugieren que la activación de autofagia por Beclina 1 está fuertemente asociada con su función supresora de tumores. La sobreexpresión de Beclina 1 en líneas celulares de carcinoma de mama induce autofagia e inhibe la proliferación celular (Liang et al., 1999). Estudios *in vivo* muestran que la supresión monoalélica de Beclina 1 inhibe la autofagia e induce la proliferación celular (Qu et al., 2003). Estos resultados, en conjunto, apoyan la idea que la inducción de autofagia y la función de inhibición de tumores de Beclina 1 están íntimamente interconectados.

**UVRAG** (*UV radiation Resistance Associated Gene*) es otra proteína supresora de tumores que induce autofagia. UVRAG promueve la unión de Beclina 1 a la PI3K clase III, formándose el complejo e induciéndose la actividad de PI3KIII. Varios tipos de tumores como los tumores de colon, gástricos y de mama presentan una deleción monoalélica o mutación en el gen UVRAG (Ionov et al., 2004; Kim et al., 2008; Bekri et al., 1997).

**Bif 1** (*BAX-interacting factor-1*) es otro gen supresor de tumores inductor de autofagia. De forma similar a UVRAG, Bif 1 promueve la interacción de Beclina 1 con la enzima PI3KIII activando la autofagia. Se ha observado que la pérdida de Bif 1 impide la formación de autofagosomas e induce la formación de tumores en ratones (Takahashi et al., 2007). Además la expresión de Bif 1 es mínima en tumores gástricos de colon y próstata (Lee et al., 2006; Coppola et al., 2008; Kim et al., 2008).

### **Los genes oncogénicos inhiben la autofagia**

La mayoría de los genes oncogénicos descritos hasta la fecha son proteínas que forman parte de la vía de señalización PI3K. Dichas proteínas inhiben la autofagia y promueven la tumorogénesis. A continuación se describirán algunos de ellos.

Además de las funciones ya conocidas de **mTOR**, como son la traducción de proteínas, proliferación celular y supervivencia, mTOR es un inhibidor clave de la autofagia. En condiciones ricas de nutrientes, TORC1 se activa y fosforila varias proteínas como ULK1 (*Unc-51-Like Kinase 1*), ULK2 (*Unc-51-Like Kinase 2*) y Atg13 (*Autophagy-related gene*), inhibiendo la autofagia. Por el contrario, en condiciones de privación de nutrientes, TORC1 es inactivado,

resultando en la estimulación de ULK1 y ULK2 que disparan la cascada autofágica (Yang et al., 2005).

En el año 1998 se descubre que la proteína antiapoptótica **Bcl-2** se une a Beclina 1 y se postula que podría jugar un papel en la autofagia (Liang et al., 1999). Estudios posteriores muestran que la unión de Bcl-2 a Beclina 1 impide la interacción de Beclina 1 con la PI3KIII, con lo cual se inhibe la autofagia (Saeki et al., 2000; Pattingre et al., 2005; Maiuri et al., 2007a).

## **ii) Papel de la autofagia en supervivencia tumoral**

Los datos presentados arriba apoyan la idea de que la estimulación autofágica funciona como un proceso supresor de tumores y que su inhibición conduce a la carcinogénesis. Sin embargo, frente a determinados estímulos agresores externos, tales como la privación de nutrientes, hipoxia, anoikis y agentes quimioterapéuticos, la activación de la autofagia contribuye a la supervivencia del tumor.

### **a) La autofagia es inducida por privación de nutrientes**

Cuando la célula se enfrenta a situaciones de estrés como la privación de nutrientes, la autofagia se activa y protege a la células evitando que mueran por apoptosis. La activación de la autofagia conduce a la degradación de material celular para generar nutrientes y energía (Yen and Klionsky, 2008).

### **b) La autofagia es inducida por hipoxia**

La hipoxia es un evento común en los tumores que resulta de una irrigación inadecuada y se asocia a un fenotipo muy maligno, una mayor predisposición a la metástasis y a un peor pronóstico. Un estudio pionero mostró que la autofagia es inducida en el núcleo hipóxico del tumor, logrando la supervivencia de las células tumorales (Degenhardt et al., 2006). No se conoce con exactitud el papel de la autofagia en las células hipóxicas.

### **c) La autofagia es inducida por anoikis**

Las células epiteliales dependen de la adhesión a la matriz extracelular (MEC) para crecer y sobrevivir. Cuando una célula se desprende de la MEC, sufre un evento denominado “anoikis”, un tipo de muerte celular apoptótica (Frisch and Francis, 1994). Se ha observado que la autofagia es inducida en células transformadas y en células epiteliales normales tras su desprendimiento de la MEC (Fung et al., 2008), lo que sugiere que la autofagia es fundamental para resistir la anoikis. Se postula que las células tumorales podrían entonces desencadenar el proceso de autofagia para sobrevivir tras el desprendimiento del sitio primario y durante la migración a sitios distantes (Kenific et al., 2010).

### **iii) Papel dual de la autofagia en respuesta a agentes quimioterapéuticos**

En el caso de los agentes quimioterapéuticos, existen múltiples estudios que muestran que la autofagia juega un papel dual. En determinadas ocasiones, la autofagia funciona como un mecanismo protector frente a un determinado compuesto, mientras que en otras circunstancias, la autofagia contribuye a la muerte del tumor. A continuación se describen cada uno de estos casos.

#### **a) Autofagia como mecanismo protector**

Varios tipos de agentes quimioterapéuticos inducen la acumulación de autofagosomas en las células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* (Maiuri et al., 2007b). Durante mucho tiempo se pensaba que estos agentes podrían ejercer su efecto antitumoral mediante la activación de la autofagia y la célula moriría por una vacuolización masiva del citoplasma, a lo que se le denominó “muerte celular autofágica”. Sin embargo, esta perspectiva ha cambiado en los últimos tiempos, ya que se ha observado en muchas ocasiones que la inhibición química y farmacológica de la autofagia contribuye a la muerte celular durante el tratamiento (Chen and Karantza-Wadsworth, 2009; Carew et al., 2007; Apel et al., 2008; Nahta et al., 2005; Esparis-Ogando et al., 2008; Roperio et al., 2004). Estos estudios muestran claramente que la inducción de autofagia representa un intento del tumor para sobrevivir, lo que llevó a la idea de que la autofagia funcionaría en estos casos como un mecanismo protector.



## b) Autofagia como mecanismo de muerte

A pesar de la gran cantidad de evidencia que muestra que la autofagia tiene un papel protector en las terapias antitumorales, se ha observado que en determinados tipos de tratamientos, la autofagia es capaz de eliminar al tumor mediante un mecanismo de “muerte celular autofágica”. Existen algunos estudios que muestran que la autofagia puede constituir un mecanismo de muerte en las terapias contra el cáncer (Abe et al., 2011; Yu et al., 2004).

## iv) Inhibidores de la autofagia

Con la finalidad de comprender bien un determinado proceso biológico es fundamental en muchas ocasiones modular la actividad de dicho proceso. Uno de los mayores problemas en la investigación actual de la autofagia consiste en la falta de inhibidores y activadores específicos de dicho proceso. Sin embargo, existen algunos compuestos moduladores que han resultado de gran utilidad. A continuación se describen los inhibidores más relevantes a este estudio, la Bafilomicina A1, la Cloroquina y la 3-Metiladenina.

La **Bafilomicina A1 (BAF)** es un antibiótico del tipo macrólido aislado de *Streptomyces griseus* (Werner et al., 1984), que ha resultado ser un inhibidor específico de la enzima ATPasa de tipo V (Bowman et al., 1988). La VATPasa es una clase de  $H^+$ ATPasa que está presente en los orgánulos del sistema vacuolar central tales como los lisosomas y es responsable de mantener el interior de estos compartimentos en un ambiente ácido mediante el bombeo de  $H^+$  a través de la membrana (Moriyama and Nelson, 1989). Por tanto, la inhibición de la enzima VATPasa conduce a una alcalinización de los lisosomas (Yoshimori et al., 1991). En relación con la autofagia, se ha observado que la acidificación del espacio luminal de los lisosomas por la bomba VATPasa es importante para que se lleve a cabo la fusión del lisosoma con el autofagosoma. Como resultado, la inhibición por BAF evita la fusión autofagosoma-lisosoma impidiendo la síntesis del autofagolisosoma y como resultado la autofagia es inhibida en sus fases finales (Yamamoto et al., 1998).

Otro inhibidor de autofagia ampliamente utilizado es la **Cloroquina (CQ)**. Este compuesto en su forma no protonada difunde libremente a través de la membrana celular y orgánulos. Cuando la CQ penetra en compartimentos ácidos como el lisosoma y autofagolisosoma, se protona debido al bajo pH existente en el interior de estas estructuras. Una vez protonada, la CQ

queda atrapada dentro de estos compartimentos y la acumulación de la forma protonada de CQ conduce a un ambiente más alcalino. Como resultado, las enzimas lisosomales (que funcionan a pH ácidos) se inhiben y no se puede llevar a cabo la degradación de los componentes lisosomales ni del autofagolisosoma (Solomon and Lee, 2009; Kimura et al., 2013).

Otro inhibidor de autofagia, la **3-Metiladenina (3-MA)**, inhibe la enzima PI3KIII, que es esencial en las fases tempranas de la autofagia. En las etapas iniciales de la autofagia, Beclina 1 forma un complejo con PI3KIII y otras proteínas constituyendo un gran núcleo proteico. (Fimia et al., 2007; Liang et al., 2006). Dentro de este núcleo, la enzima PI3KIII fosforila el PI para sintetizar PIP, el cual presumiblemente permite el reclutamiento a la membrana de aislamiento de proteínas que participan en la autofagia (proteínas Atg). Estudios iniciales en células hepáticas de rata muestran que 3-MA inhibe la degradación endógena de proteínas sin afectar la degradación exógena de proteínas ni la síntesis proteica, lo que demuestra que 3-MA inhibe la autofagia de forma específica sin afectar otros procesos como la endocitosis o la síntesis de proteínas (Seglen et al., 1981).

#### v) Métodos de detección de autofagia

Existen diversos métodos para detectar la autofagia. En este trabajo se han utilizado tres aproximaciones experimentales diferentes para la detección de autofagia: la determinación de niveles de proteínas autofágicas por Western blot, el estudio de la formación de orgánulos vesiculares ácidos (O.V.A.s) y el estudio de localización de la proteína de fusión GFP-LC3. El estudio de la formación de O.V.A.s y el estudio de localización de la proteína de fusión GFP-LC3 se describen detalladamente en el apartado de Materiales y Métodos. A continuación describiremos brevemente los marcadores autofágicos más comúnmente utilizados en experimentos de Western blot (y que han sido utilizados en este trabajo).

**LC3-II:** Uno de los marcadores más ampliamente utilizado para la determinación de autofagia es la proteína LC3-II, que se forma a partir de LC3-I cuando la autofagia es inducida. LC3 es sintetizada en todas las células eucariotas en condiciones basales. Una vez sintetizada, el extremo C-terminal de LC3 es fragmentado por la proteasa Atg4 para producir LC3-I, que se localiza de forma difusa en todo el citosol de la célula. Cuando la autofagia es inducida, LC3-I se conjuga covalentemente con la fosfatidiletanolamina (PE) para formar una nueva molécula denominada LC3-II, que es un conjugado de LC3-PE. Este evento de conjugación ocurre a través



de una compleja cascada enzimática formada por varias proteínas que incluyen Atg7, Atg3 y el complejo Atg5-Atg12 (Ichimura et al., 2000; Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008b). Debido a la presencia del fosfolípido PE, LC3-II una vez sintetizada se inserta tanto en la membrana interna como externa del autofagosoma y parece ser esencial en su proceso de formación (Nakatogawa et al., 2007; Kabeya et al., 2000; Sou et al., 2008; Fujita et al., 2008a). Tras la maduración del autofagosoma, la proteína LC3-II localizada en la membrana externa es fragmentada por proteasas y reciclada mientras que la proteína LC3-II de la membrana interna es degradada en el lisosoma (Tanida et al., 2004a; Kirisako et al., 2000). Debido a que LC3-II se inserta en los autofagosomas, un aumento en los niveles de LC3-II y la aparición de un puntillado característico en experimentos de transfección con la proteína de fusión GFP-LC3 son indicadores fiables para estimar un aumento en la formación de autofagosomas (Mizushima et al., 2001).

Sin embargo, es importante tener en cuenta que la autofagia es un proceso dinámico de degradación, en el cual los autofagosomas se están continuamente formando y degradando. Así, el número de autofagosomas observados a un determinado tiempo es una función del balance entre su velocidad de formación y su velocidad de conversión en autofagolisosomas (fusión de autofagosoma-lisosoma). Como resultado, una acumulación de autofagosomas puede representar una inducción de la autofagia o una inhibición de las fases finales de este proceso, una vez formado el autofagosoma. Por este motivo, es importante utilizar otro tipo de ensayos además de LC3 para confirmar la inducción de autofagia en las células.

**p62:** Otro marcador autofágico utilizado con gran frecuencia es la proteína p62. Esta proteína se localiza en el autofagosoma y es continuamente degradada por autofagia, con lo que una disminución en los niveles totales de p62 por Western blot indicarían una inducción del proceso autofágico. En los últimos años se ha intentado esclarecer el papel del p62 en la autofagia. Existe evidencia que p62 conjuntamente con proteínas ubiquitinadas son transportadas a los autofagosomas, sugiriendo que p62 actúa como receptor de proteínas ubiquitinadas para ser degradadas en los lisosomas (Bjorkoy et al., 2005; Pankiv et al., 2007). Las células con autofagia deficiente presentan inclusiones que son positivas para ubiquitina y p62 (Komatsu et al., 2007; Nezis et al., 2008), lo que sugiere que las proteínas ubiquitinadas interactúan con p62, forman un complejo y los agregados proteicos son finalmente degradados por autofagia (Lamark et al., 2009; Kirkin et al., 2009).

**Complejo Atg5-Atg12:** Atg5 se encuentra conjugado de manera constitutiva a Atg12 y se ha demostrado que dicha conjugación es esencial para la formación del autofagosoma (Mizushima et al., 2001; Mizushima et al., 1998). El complejo Atg5-Atg12 es crítico en la conversión de LC3-I a la forma lipidada LC3-II (unida a PE), debido a que este complejo presenta actividad tipo E3 que transfiere la proteína LC3 desde Atg3 a la PE para formar LC3-PE o LC3-II (Fujita et al., 2008a). Si bien no se conoce el mecanismo preciso de regulación del complejo Atg5-Atg12, algunos estudios han mostrado que la expresión de dicho complejo aumenta en presencia de algunos agentes quimioterapéuticos, con lo cual los aumentos en los niveles de complejo Atg5-Atg12 es considerado por algunos autores como marcador de inducción de autofagia (Yuk et al., 2009; Wang and Levine, 2011). En un estudio realizado en células madre de embrión se ha observado que en presencia de un estímulo autofágico como es la privación de nutrientes, el conjugado Atg12-Atg5 se trasloca desde el citosol a la membrana de aislamiento (membrana precursora de la membrana del autofagosoma) y una vez formado el autofagosoma, se disocia de su membrana, lo que indica que dicho complejo juega un papel crítico en la formación del autofagosoma (Mizushima et al., 2001).

**Beclina 1:** como hemos mencionado anteriormente, la proteína Beclina 1 es un regulador clave que participa en las etapas iniciales de la autofagia. Aunque no se conoce su mecanismo exacto de regulación, se ha demostrado que la formación del complejo Beclina 1-PI3KIII es clave para la formación del autofagosoma e inducción de autofagia (Liang et al., 1999; Kihara et al., 2001). El núcleo Beclina-PI3KIII (Fimia et al., 2007; Liang et al., 2006) fosforila el IP sintetizándose PIP que podría reclutar proteínas relacionadas con autofagia a la membrana. Diversos trabajos muestran que los niveles de expresión de Beclina 1 aumentan en presencia de determinados estímulos autofágicos (Yuk et al., 2009), con lo que el aumento en los niveles de Beclina es considerado un marcador de autofagia en muchos tumores.

# **OBJETIVOS**



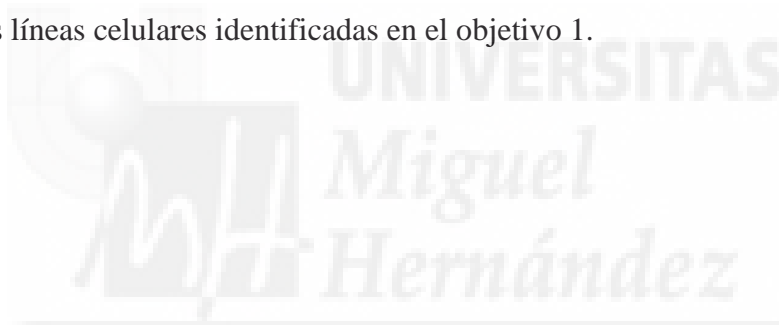
## **Objetivos I**

El **objetivo principal** de la primera parte de este trabajo consiste en identificar marcadores moleculares de resistencia al tratamiento con el inhibidor de MEK1/2, AZD6244 en líneas de carcinoma colorrectal humanas.

Este objetivo principal se desglosa en los siguientes **objetivos específicos**:

1) Estudiar el efecto de AZD6244 sobre la proliferación y ciclo celular con el fin de identificar aquellas líneas celulares que respondan o no a dicho tratamiento y clasificar dichas líneas celulares en sensibles y resistentes a AZD.

2) Identificar genes o moléculas de las rutas de señalización RAF/MEK/ERK y PI3K/AKT/mTOR/p70S6K que puedan estar relacionadas con la resistencia a AZD6244 que presentan las líneas celulares identificadas en el objetivo 1.



## **Objetivos II**

El **objetivo principal** de la segunda parte de este trabajo consiste en estudiar el efecto de AZD6244 sobre muerte celular y autofagia en las líneas celulares de carcinoma colorrectal sensibles y resistentes a dicho fármaco. En caso de detectarse una inducción en autofagia, investigar el papel que juega dicho proceso en la respuesta al tratamiento con AZD6244.

El objetivo principal se llevará a cabo mediante los siguientes **objetivos específicos**:

- 1) Estudiar el efecto de AZD6244 sobre la muerte celular y autofagia en la línea celular resistente HGUE-C-1 y en la línea celular sensible SW480.
- 2) Investigar el efecto de la inhibición e inducción de autofagia sobre la muerte celular inducida por AZD6244.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



## **Líneas celulares**

Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon SW620, SW480, HT-29, LS 174T, HCT-15, Caco-2 y DLD-1 fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (*American Type Culture Collection*, ATCC). La línea celular tumoral HGUE-C-1 fue establecida en nuestro laboratorio a partir de líquido ascítico de un paciente de 76 años de edad con cáncer de colon. Todas las líneas celulares a excepción de HCT-15 fueron cultivadas en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Laboratorios PAA GmbH Pasching, Austria) suplementado con penicilina/estreptomicina 50 U/mL (Laboratorios PAA GmbH Pasching, Austria) y suero bovino fetal (SBF) al 10% (Laboratorios PAA GmbH Pasching, Austria). La línea celular HCT-15 fue cultivada en medio de cultivo RPMI. Todas las líneas celulares se cultivaron a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>.

## **Reactivos**

AZD6244 y NVP-BEZ235 fueron adquiridos en ChemieTek (Indianapolis, IN, USA), PF 4708671 y Bafilomicina A1 en ToCris Bioscience (Bristol, BS11, UK) y 3-Metiladenina, Rapamicina y Cloroquina en Sigma (Saint Louis, MO 63103, USA).

## **Ensayo de proliferación celular MTT**

Para el estudio de la proliferación celular se empleó el ensayo de viabilidad que utiliza el reactivo bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Mosmann, 1983). Dicho ensayo es un método colorimétrico que se basa en la determinación de la funcionalidad de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. En eucariotas, esta enzima es capaz de reducir el reactivo MTT que es una sal de tetrazolio soluble de color amarillo convirtiéndolo en un producto azul intenso insoluble (MTT formazán). La finalidad de este ensayo consiste en la valoración del número de células viables en función del MTT metabolizado.

Para este estudio, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo plano a diferentes densidades dependiendo de la línea celular. Al cabo de 24 horas, las células fueron tratadas con concentraciones crecientes de fármaco (cada concentración por sextuplicado), se dejaron crecer durante 72 horas y se añadió el reactivo MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 0,25 mg/ml. Tras 3 horas de incubación con el reactivo, se retiró el

medio de cultivo y los cristales de formazán formados en el interior de las células fueron solubilizados en 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Las placas se mantuvieron durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente y la absorbancia resultante se leyó en un lector de microplacas modelo Anthos (2001) a 570 nm. La inhibición de la proliferación celular producida por AZD se calculó como el porcentaje de la absorbancia control en ausencia de dicho compuesto. Los datos que se muestran consisten en al menos tres experimentos independientes +/- SEM (error experimental de la media).

### **Ensayo de formación de colonias en agar blando**

Este estudio se realizó en colaboración con M<sup>a</sup> Angeles Ros y Elena Tristante de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer del Hospital de la Arrixaca. La finalidad del mismo consistió en investigar el efecto de AZD sobre la capacidad de proliferación celular independientemente de anclaje, lo que es indicativo de la capacidad de transformación de las células tumorales. Las células no crecen adheridas a una placa de Petri, sino suspendidas en agar blando. Para llevar a cabo este ensayo, se vierten en una placa de Petri dos capas de agar blando de diferentes concentraciones, una capa inferior con agar al 0,6% y una capa superior con agar al 0,36%, conteniendo las células.

En primer lugar se procedió a formar la capa de agar blando inferior (en contacto con la placa de Petri). Para ello, se realizó una mezcla (volumen final 1ml) conteniendo medio de cultivo (DMEM o RPMI-1640), suero bovino fetal al 10% y agar al 0,6% (Bacto-agar, Becton Dickinson), que fue mantenida a 42°C para evitar su solidificación. La mezcla líquida fue vertida en placas de 6 pocillos y se mantuvo a temperatura ambiente sin moverla hasta su solidificación.

A continuación, se procedió a formar la capa de agar superior. Para ello, 13,000 células fueron resuspendidas en 0,8 ml de medio de cultivo conteniendo suero bovino fetal al 10%, agar blando al 0,36% (Bacto-agar, Becton Dickinson) y AZD o DMSO (condición control). Dicha mezcla fue vertida sobre la base de agar previamente formada y solidificada (con mucho cuidado de no romperla e intentando no producir burbujas). Se dejó enfriar la mezcla y una vez solidificada la capa superior, se colocó en el incubador a 37°C y se dejaron crecer las células. Cada 4-6 días se añadió medio de cultivo fresco para evitar la deshidratación del agar. Tras 14 días de incubación, se añadió a cada placa 1 ml de IodoNitroTetraZolio (0,5 mg/ml) (Sigma Aldrich) y se dejó durante toda la noche para teñir las colonias de células. Al día siguiente se

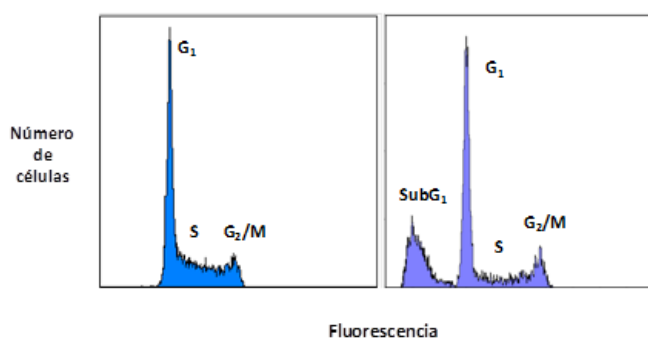


contaron las colonias mayores a 100  $\mu\text{m}$  de toda la placa utilizando un escáner de luz visible (Image Scanner III GE Healthcare) y el software Image Quant TL (GE Healthcare). Cada experimento se realizó por triplicado.

### Estudio de las fases del ciclo celular

El contenido de ADN de cada célula varía dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentra (fase  $G_1$ , fase S ó fase de síntesis de ADN, fase  $G_2$  y fase de mitosis o fase M). Así, las células que se encuentran en la fase  $G_2$  y fase M del ciclo celular, tendrán el doble de ADN respecto a las células en fase  $G_1$ , ya que éstas han sintetizado y duplicado su material genético ( $4n$ ). Por su parte, las células que se encuentran en la fase S de síntesis de ADN, tendrán un contenido intermedio entre las células que se encuentran en la fase  $G_1$  y las que se encuentran en las fases  $G_2$  y M.

Con la finalidad de estudiar las diferentes fases del ciclo celular se empleó yoduro de propidio (IP), un agente fluorescente que se intercala entre los ácidos nucleicos. Las células emitirán mayor o menor fluorescencia en función de su contenido de ADN. Así, las células que se encuentran en la fase  $G_2$  y M que ya han sintetizado y duplicado su material genético, darán el doble de señal de fluorescencia respecto a las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Por su parte, las células en la fase S (fase de síntesis de ADN), darán una señal de fluorescencia intermedia entre  $G_1$  y  $G_2/M$ . Cabe destacar que mediante esta técnica es posible la detección de células muertas. Cuando una célula muere, su ADN se fragmenta y por tanto estas células emiten fluorescencia de menor intensidad respecto a las células que tienen el ADN íntegro. Esta fluorescencia aparece como un pico de intensidad menor y se le denomina fase  $\text{Sub}G_1$  (Figura 7).



**Figura 7: Perfiles de ciclo celular obtenidos mediante citometría de flujo por marcaje del ADN con IP.** En la imagen de la derecha se observa la aparición de un pico ( $\text{Sub}G_1$ ), indicativo de muerte celular.

Para los ensayos de ciclo celular, las células fueron sembradas en frascos de 25 cm<sup>2</sup> y a las 24 horas fueron tratadas con el compuesto indicado. Transcurridas el tiempo correspondiente, las células fueron recolectadas por tripsinización, lavadas con PBS y fijadas con etanol al 70% durante al menos 30 minutos a -20°C. Tras la fijación, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en PBS conteniendo ARNasa A (Ribonucleasa A) (SERVA) a una concentración final de 25 µg/ml durante 15-30 minutos a 37°C para degradar el ARN. Finalmente se agregó el fluoróforo ioduro de propidio (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 25·10<sup>-3</sup> µg/ml y se dejó incubando la mezcla durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, el contenido de ADN de las células marcadas fue analizado mediante un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter) que contiene un láser de argón que excita a 488 nm. El ioduro de propidio es un fluoróforo que se excita a 480 nm y emite fluorescencia roja a 620 nm, aproximadamente.

### **Obtención de extractos de proteína**

Para obtener los extractos de proteína total, las células fueron sembradas en placas Petri. Una vez finalizados los tratamientos correspondientes, las células fueron lavadas con PBS frío, despegadas de las placas mediante un raspador y recolectadas en tubos cónicos. A continuación, las células fueron centrifugadas y el pellet celular fue resuspendido nuevamente en PBS para lavar y eliminar los restos de medio de cultivo. Seguidamente, las células fueron nuevamente centrifugadas y el pellet (conteniendo las células enteras) fue resuspendido en tampón de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 30 mM Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> y 50 mM Tris-HCl, pH 7,4). El volumen de tampón de lisis añadido a cada muestra fue variable (entre 60-120 µL) y dependió del tamaño del pellet. A cada muestra se le añadió también un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich), en una relación de 1 µL por cada millón de células. A continuación las células fueron transferidas a tubos de 1,5 ml, incubadas en hielo durante 30 minutos (para que se llevara a cabo la lisis) y congelados a -20°C para su posterior uso. En el momento de utilizar las muestras, los lisados fueron descongelados y centrifugados a velocidad máxima (16,000 x g) en una microcentrífuga durante 5 minutos a 4°C, para precipitar el material no solubilizado (células enteras, restos de membrana, etc). El sobrenadante constituyó el extracto de proteína total.

## Método de Bradford

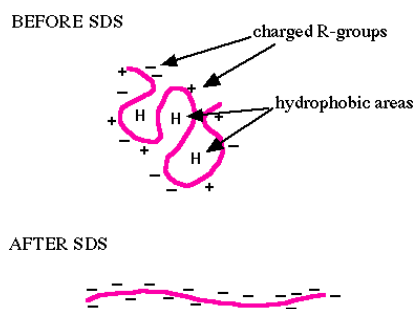
La concentración de proteínas fue determinada utilizando el método colorimétrico Bradford (Bradford, 1976) que se basa en el cambio de absorbancia del colorante azul de Coomassie Brillante G-250 cuando éste se une a las proteínas.

El Azul Brillante de Coomassie G-250 existe en dos formas de color diferentes, rojo y azul, dependiendo del pH de la solución. En una solución notablemente ácida (pH 0-1), el colorante se encuentra en su forma catiónica (+) de color rojo y en una solución neutra y alcalina, el colorante se encuentra en su forma aniónica (-) de color azul. Cuando el colorante se une a las proteínas, ocurren una serie de reacciones que hacen que pase de su forma roja (máximo de absorbancia a 465 nm) a su forma aniónica desprotonada de color azul que presenta su máximo de absorbancia a 595 nm. Por tanto, la cantidad de complejo colorante-proteína presente en solución es una medida de la concentración de proteína y puede ser estimada por la medida de la absorbancia a 595 nm. De esta forma, la concentración de proteína es proporcional a la absorbancia a 595 nm.

Para la determinación de proteínas se realizó una recta de calibración utilizando como proteína patrón albúmina de suero bovino (ASB) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1 mg/ml y se midió la absorbancia de cada muestra en el espectrofotómetro a 595 nm. La concentración de las muestras se determinó interpolando su valor de absorbancia en la curva de calibración para obtener sus concentraciones.

## Análisis de proteínas por Western Blot

**a) Preparación de muestras:** Tras determinar la concentración de proteína de cada extracto celular (método de Bradford) se prepararon las muestras para su posterior separación por electroforesis de la siguiente manera: en un vial se añadieron entre 60-80  $\mu\text{g}$  de proteína, una quinta parte de tampón de muestra 5x (312,5 mM Tris pH 6,8, 10% SDS, 50% glicerol, 0,5% (p/v) azul de bromofenol y 5%  $\beta$ -mercaptoetanol) y tampón de lisis para igualar los volúmenes finales. El detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) contenido en el tampón de muestra es un compuesto iónico desnaturizante que en presencia de proteínas envuelve su esqueleto de polipéptido y como resultado la proteína adopta carga negativa (Figura 8). Posteriormente a su preparación, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 95°C para la completa desnaturización de las proteínas.

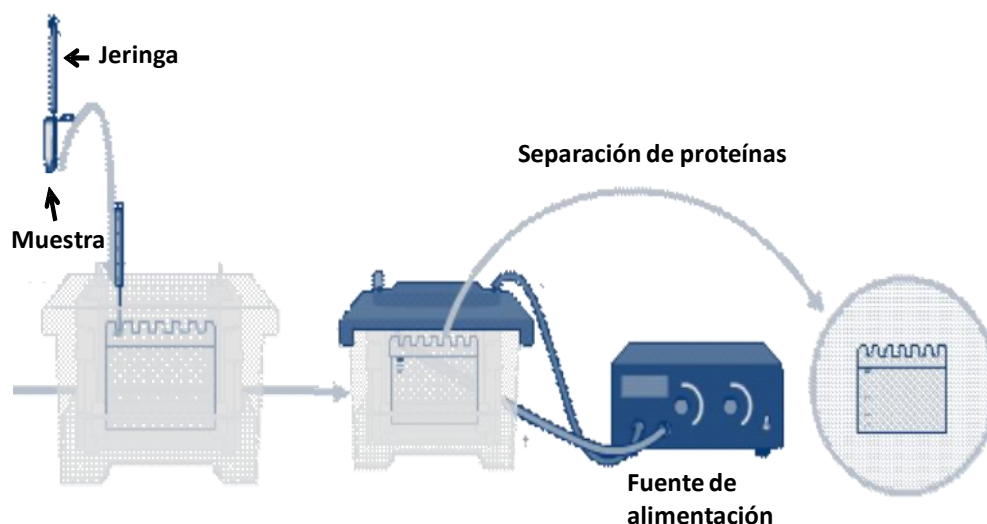


**Figura 8: Desnaturalización de proteínas mediante SDS.** La figura superior muestra las cargas (+) y (-) de una proteína debido a sus grupos laterales cargados (grupos-R). Las letras “H” representan dominios hidrofóbicos debidos a grupos laterales R no polares de la proteína que se han agrupado en el interior para “escapar” del ambiente polar proporcionado por el agua que rodea a la proteína. En presencia de SDS (panel inferior), se distorsionan las regiones hidrofóbicas y el SDS cubre la proteína con cargas negativas (la gran cantidad de cargas negativas del SDS superan a las cargas positivas de la proteína). Como resultado la proteína es desnaturalizada (se reduce a su estructura primaria) y se lineariza (Imagen tomada de la página web [www.biodavidson.edu/Courses/genomics/method/SDSPAGE](http://www.biodavidson.edu/Courses/genomics/method/SDSPAGE)).

**b) Preparación de los geles de poliacrilamida:** Antes de proceder al desarrollo electroforético, se prepararon los geles de poliacrilamida de 10 calles y 1,5 mm de grosor. Los geles están formados por una porción inferior separadora (gel separador) y una porción superior concentradora (gel concentrador). Ambos geles (separador y concentrador) se preparan utilizando los mismos componentes: H<sub>2</sub>O milliQ, tampón de “stacking” o separador, SDS, acrilamida/bisacrilamida, persulfato de amonio y TEMED, en diferentes concentraciones. La poliacrilamida es un polímero formado por monómeros de acrilamida que se polimerizan formando un polímero lineal de poliacrilamida. Este polímero lineal en presencia de metilénbisacrilamida se ramifica. El gel concentrador contiene un 4,5% de poliacrilamida, mientras que el porcentaje de poliacrilamida del gel separador se escoge en cada caso en función del peso molecular de las proteínas a detectar. Las funciones de cada porción del gel son diferentes. Así, el gel concentrador sirve de soporte para cargar las muestras y además, concentra las proteínas de la muestra en un solo punto, por lo que las proteínas entran en el gel separador al mismo tiempo. Por su parte, en el gel separador se desarrolla la separación de las proteínas propiamente dicha.

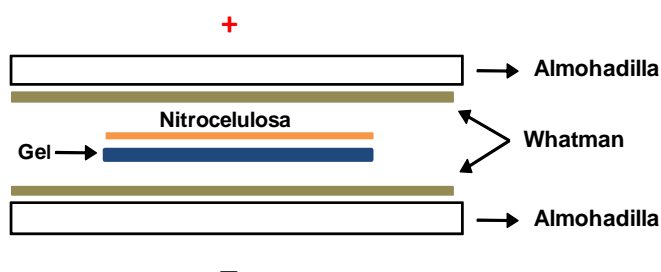
**c) Desarrollo electroforético:** Las muestras de proteína fueron separadas en condiciones desnaturalizantes por SDS-PAGE (“*Sodium Dodecyl Sulfate-PoliAcrilamide Gel Electrophoresis*”) utilizando el sistema Mini protean 3 de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories,). La técnica SDS-PAGE está basada en la utilización de geles de poliacrilamida que contienen SDS

para conferir carga negativa a las proteínas, por lo que éstas son separadas únicamente en función de su tamaño o peso molecular. Para llevar a cabo la electroforesis, las muestras fueron colocadas en el gel de poliacrilamida sumergido en tampón de electroforesis (Tris 20 mM, glicina 0,2 M, SDS 0,1% p/v a pH 8,3) y se aplicó un voltaje entre 80 y 150 V (Figura 9).



**Figura 9: Sistema de electroforesis de proteínas de Bio-Rad** (imagen tomada de la página web [www. Bio-Rad.com](http://www.Bio-Rad.com)).

**d) Transferencia:** Tras la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana de nitrocelulosa o PVDF (Bio-Rad Laboratories) mediante la aplicación de voltaje en un tampón de transferencia (25 mM base Trizma, 192 mM Glicina, 20% de metanol, pH 8,6). Para ello se formó un sándwich compuesto por el gel de poliacrilamida, una membrana de nitrocelulosa, dos almohadillas, dos papeles absorbentes (Whatman®) y el respectivo soporte, tal y como se indica en la Figura 10.



**Figura 10: Sándwich de transferencia.** Para la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa se formó un sándwich compuesto por el gel, la membrana de nitrocelulosa, dos almohadillas, y dos papeles absorbentes tal como se muestra en la figura.

Una vez formado el sándwich en el soporte, se sumergió en una cubeta con tampón de transferencia (25 mM Trizma base, 192 mM Glicina, 20% de metanol, pH 8,6) que se conectó a una fuente de alimentación. La membrana tiene carga positiva y por tanto, al aplicar voltaje, las proteínas (con carga negativa) migran hacia ella y quedan inmovilizadas. La transferencia se realizó a 4°C durante una hora y media a 100 mV.

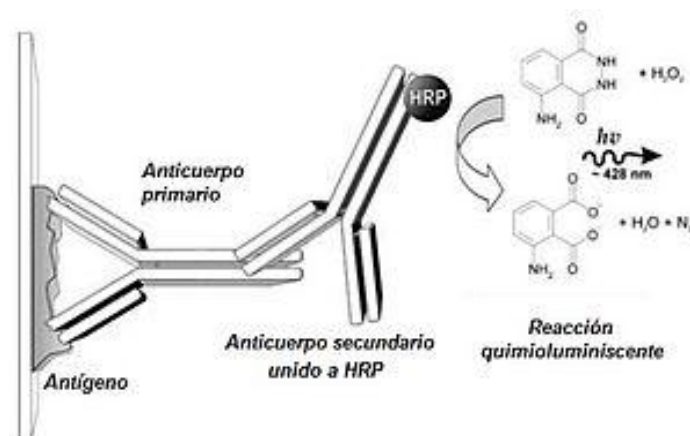
**e) Bloqueo.** Una vez transferidas las proteínas a la membrana de nitrocelulosa o PVDF, se procedió al bloqueo de la membrana. Para ello, la membrana fue incubada con leche desnatada en polvo al 5% reconstituida en tampón TBST (Tris, NaCl y 0,05% Tween 20), durante una hora a temperatura ambiente. Durante el bloqueo, las proteínas de la leche se unen inespecíficamente a todas las porciones de la membrana que no hayan absorbido proteínas. De esta forma, se evita la unión inespecífica de los anticuerpos a usar, incrementando la probabilidad de que el anticuerpo se una solo a su antígeno.

**f) Incubación con anticuerpos:** Una vez bloqueada, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario de interés en un agitador a 4°C durante toda la noche. Los anticuerpos primarios fueron preparados a la concentración adecuada en tampón TBST, leche desnatada al 2% y azida sódica al 0,2%. Al día siguiente, la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con tampón TBST e incubada con los anticuerpos secundarios correspondientes durante una hora en agitación y temperatura ambiente. Se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios: anti-conejo o anti-ratón (GE Healthcare), los cuales se encuentran conjugados a la enzima peroxidasa de rábano. Los anticuerpos secundarios fueron preparados en tampón TBST y 1% de leche desnatada en polvo a una dilución final 1:5,000. Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la membrana fue lavada tres veces con tampón TBST. Los dos primeros lavados se realizaron con tampón TBST, y el último, con TBS sin Tween, ya que se ha observado que el Tween interfiere en la reacción de revelado.

Proteína a detectar	Marca	Referencia	Reconocimiento
fosfo-Akt	Cell Signaling Technology®	#9271	Ser 473 fosforilada
Akt	Santa Cruz Biotechnology®	sc-8312	Residuos 341-480 de Akt
fosfo-mTOR	Cell Signaling Technology®	#2974	Ser 2481 fosforilada
mTOR	Cell Signaling Technology®	#2972	Residuos alrededor Ser 2481
fosfo-S6K	Cell Signaling Technology®	#9234	Tre 389 fosforilada
S6K	Cell Signaling Technology®	#9202	Residuos extremo C-terminal
fosfo-RPS6	Cell Signaling Technology®	#2211	Ser 235 y Ser 236 fosforilada
RPS6	Cell Signaling Technology®	#2212	Residuos de RPS6 humana
fosfo-ERK1/2	Cell Signaling Technology®	#9101	Tre 202 y Tyr 204 fosforiladas
ERK1/2	Cell Signaling Technology®	#9102	Residuos extremo C-terminal
Retinoblastoma (Rb)	Pharmingen	554136	Aminoácidos 332-344 de Rb
LC3II	Cell Signaling Technology®	#2275	Residuos extremo N-terminal
p62	Mbl	PM045	Residuos 120-440 de p62
Beclina	Cell Signaling Technology®	#3738	Residuos que rodean Tre 72
Atg5	Novus Biologicals	NB11053818	Residuos extremo N-terminal
$\beta$ -Actina	Sigma-Aldrich	A 2066	Residuos extremo C-terminal
Hsp-90	Santa Cruz Biotechnology®	sc-13119	Residuos 610-723 de Hsp-90 $\beta$

**Tabla 3: Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de Western Blot**

**g) Revelado:** La detección de proteínas se basó en la reacción quimioluminiscente que desarrolla la enzima peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario. Dicha enzima cataliza la oxidación del sustrato luminol en presencia de peróxido de hidrógeno produciéndose quimioluminiscencia (Figura 11). Si se coloca una película fotográfica sobre la membrana, la luz que se desprende en la reacción permite detectar la actividad enzimática.



**Figura 11: Reacción quimioluminiscente.** En la figura se observa la reacción quimioluminiscente catalizada por la enzima peroxidasa de rábano (*Horse Radish Peroxidase, HRP*) que se encuentra conjugada al anticuerpo secundario.



Para este ensayo se empleó el sistema ECL (*Enhanced ChemiLuminescence*) (GE Healthcare). Tras la reacción quimioluminiscente, la luz emitida fue transmitida a películas fotográficas (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) y éstas fueron reveladas manualmente o en un revelador Kodak X-OMAT-1000-Processor.

### **Eliminación de anticuerpos de las membranas de nitrocelulosa**

En muchos casos, se ha detectado más de una proteína de peso molecular aproximado o igual en una misma membrana de nitrocelulosa. En estos casos, se incubó con el anticuerpo adecuado para la detección de la primera proteína y posteriormente se procedió a la eliminación de dicho anticuerpo para proceder a la detección de la segunda proteína con su anticuerpo correspondiente.

Para llevar a cabo la eliminación del anticuerpo, la membrana fue incubada durante 30 minutos a 50°C con tampón reductor (100 mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7), con la finalidad de romper la unión de los anticuerpos con sus antígenos. A continuación, la membrana fue lavada tres veces durante 10 minutos con TBST y bloqueada nuevamente con la solución de leche desnatada al 5%.

### **Densitometrías**

Con la finalidad de cuantificar las bandas obtenidas en las películas de revelado se empleó el programa Scion Image 4.0.3.2. Mediante la herramienta de selección se traza una línea alrededor de cada banda y el programa proporciona un valor que tiene en cuenta tanto la intensidad como el tamaño de cada banda. Para realizar las gráficas de densitometría se procedió de diferentes maneras dependiendo del experimento:

En el caso de los experimentos donde se investiga el efecto de AZD sobre los niveles de fosforilación de determinada proteína, se determinó un valor de densitometría para la banda correspondiente a la proteína total (valor x) y otro valor para la banda correspondiente a la forma fosforilada (valor y), tanto para la condición control como para la condición tratada con AZD. Los valores obtenidos de las formas fosforiladas fueron normalizados con los valores obtenidos de las formas totales (cociente x/y). Estos valores normalizados fueron expresados de forma porcentual asignando el 100% de fosforilación a la condición control en cada caso.



En el caso que se estudiaron los niveles de fosforilación de determinada proteína en condiciones basales (sin tratamiento) se determinó un valor para la banda correspondiente a la proteína total (valor x) y otro valor para la banda correspondiente a la forma fosforilada de la proteína (valor y). Los valores obtenidos de las formas fosforiladas fueron normalizados con los valores obtenidos de las formas totales (cociente x/y). Estos valores normalizados fueron representados de forma porcentual asignando el 100% de expresión a los valores encontrados en la línea celular con mayor expresión en cada caso.

En el caso de los estudios del efecto de AZD sobre los niveles totales de una proteína (estudios de AZD sobre los niveles de proteínas autofágicas) se determinó un valor de densitometría para la banda correspondiente a la proteína de interés (valor x) y otro valor para la banda correspondiente a la  $\beta$ -actina, utilizada como control de carga (valor y), tanto para la condición control como para la condición tratada con AZD. Los valores obtenidos para la proteína total fueron normalizados con los valores obtenidos para  $\beta$ -actina (cociente x/y). Estos valores normalizados fueron expresados de forma porcentual asignando el 100% de fosforilación a la condición control en cada caso.

### **Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s)**

En la etapa final del proceso de autofagia, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma formando el autofagosoma de naturaleza ácida. Para investigar si existe un aumento en la formación de autofagolisosomas, las células son incubadas en presencia del indicador fluorescente Naranja de Acridina (NA). La NA es una base débil fluorescente que al incorporarse a vesículas ácidas, se protona y es retenida en su interior hasta que se alcaliniza el sistema. El colorante que queda “atrapado” en las vesículas ácidas emite fluorescencia en la zona roja del espectro. De esta manera, se pueden cuantificar los Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s) teniendo en cuenta que un aumento en la intensidad de fluorescencia roja es proporcional al grado de acidez en la célula y por tanto a la cantidad de autofagolisosomas. Es importante tener en cuenta que como los autofagolisosomas se forman en las fases más tardías de la autofagia, esta técnica permite el análisis de las etapas finales de la autofagia.

Para llevar a cabo este estudio, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (Techno Plastic Products, TPP) y a las 24 horas fueron tratadas con AZD. Tras el tratamiento, las células

fueron recolectadas por tripsinización, lavadas con PBS y centrifugadas a 1,500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en una solución de NA (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) (Molecular Probes, Invitrogen) diluida previamente en PBS. Tras 20-40 minutos de incubación las muestras fueron analizadas por citometría de flujo utilizando un citómetro de flujo FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, California).

### **Transfección transitoria con GFP-LC3**

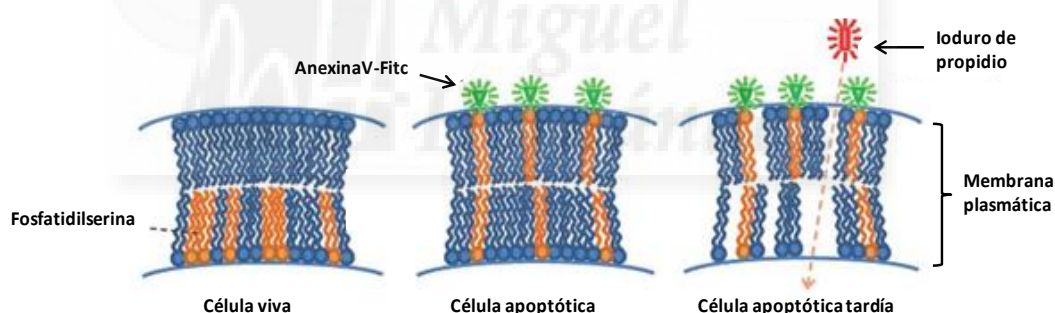
Otra técnica que hemos empleado para detectar la presencia de autofagia consistió en la transfección transitoria con la proteína de fusión GFP-LC3. Dicha proteína se sintetiza a partir de un plásmido que contiene insertos de la proteína asociada a microtúbulos, LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-Light-Chain 3*) y de la proteína fluorescente verde, GFP (*Green Fluorescent Protein*). Las células fueron transfectadas con el plásmido GFP-LC3 y posteriormente tratadas con el compuesto de interés. En ausencia de autofagia, la proteína de fusión GFP-LC3 se localiza en el citosol de la célula y la fluorescencia verde aparece de forma difusa. Sin embargo, en presencia de autofagia, la proteína de fusión GFP-LC3 se inserta en la membrana de los autofagosomas, con lo que la fluorescencia adopta un aspecto puntillado característico.

Para llevar a cabo este estudio, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos estériles colocados previamente en placas Petri de 35 mm (Techno Plastic Products, TPP). Las células se dejaron crecer durante 24 horas y al día siguiente fueron transfectadas de forma transitoria con 1  $\mu\text{g}$  de plásmido GFP-LC3 utilizando Fugene (Roche Applied Sciences), de acuerdo con las indicaciones proporcionadas por el fabricante. Brevemente, para cada muestra se colocó en un ependorf estéril 100  $\mu\text{l}$  de medio Optimem sin suero ni antibiótico, se agregó 1  $\mu\text{l}$  de una solución stock de GFP-LC3 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y 3  $\mu\text{l}$  de Fugene directamente en el medio conteniendo el DNA sin tocar las paredes. Las muestras fueron agitadas mediante vortex por uno o dos segundos e incubadas 15 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de complejo DNA/Fugene a cada placa (a las cuales previamente se les retiró el medio y añadió 1,5 ml de medio fresco) y posteriormente las placas fueron colocadas a crecer en la estufa a 37°C. A las 24 horas (las células ya estarían expresando la proteína de interés), las células fueron tratadas con AZD durante el tiempo indicado y visualizadas mediante un microscopio invertido de fluorescencia Nikon TE 300 (Nikon Osaka, Japón) utilizando un objetivo 40X.

La cuantificación de “puntos” fluorescentes de GFP-LC3 en cada experimento se realizó tomando fotos a diez campos mediante una cámara CCD Quantix 512 o CoolSnap (Roper Sci, Princeton Instruments) acoplada al microscopio. En cada campo, se contaron el número de “puntos” de GFP-LC3 de cada célula transfectada con la proteína GFP-LC3

### Estudio de la viabilidad celular mediante AnexinaV-IP

La membrana celular de las células humanas consiste en una bicapa lipídica formada por una monocapa celular interna y otra externa. En las células vivas, el fosfolípido fosfatidilserina (FS) se localiza en la superficie citoplasmática de la membrana celular. Sin embargo, en una célula apoptótica, el fosfolípido FS se transloca desde la hemicapa interna hacia la externa de la membrana celular quedando expuesto al espacio extracelular (Figura 12). El agente anticoagulante anexinaV, consiste en una proteína de 35–36 KDa con capacidad de unirse a los fosfolípidos y presenta una gran afinidad por el fosfolípido FS. Con la finalidad de detectar células apoptóticas, la proteína anexinaV puede ser marcada con diversos fluoróforos, tales como FITC (isotiocianato de fluoresceína).



**Figura 12: Unión de AnexinaV-FITC al fosfolípido de membrana fosfatidilserina (FS) en una célula apoptótica.** En apoptosis tardía, además de producirse la unión AnexinaV-FITC a FS, el ioduro de propidio penetra en el interior celular debido a la pérdida de integridad de la membrana. La imagen fue obtenida de Dojindo Molecular Technologies Inc ([www.dojindo.com](http://www.dojindo.com)).

Se debe tener en cuenta que la traslocación del fosfolípido FS hacia la superficie externa de la membrana celular es un evento que ocurre tempranamente en el proceso de apoptosis y precede a la pérdida de la integridad de membrana que acompaña las etapas finales de la apoptosis. Es por este motivo que en este ensayo además de AnexinaV, se utiliza también el colorante vital Ioduro de Propidio. El IP, es impermeable a las células vivas y células apoptóticas tempranas, ya que dichas células al conservar la integridad de membrana celular son capaces de excluir el colorante. Sin embargo, las células que presentan su membrana celular dañada, como

las células apoptóticas tardías o células necróticas, son incapaces de excluir el colorante y de esta forma quedan marcadas. Una vez dentro de la célula muerta, el IP se une fuertemente al ADN y la célula emite luz fluorescente roja.

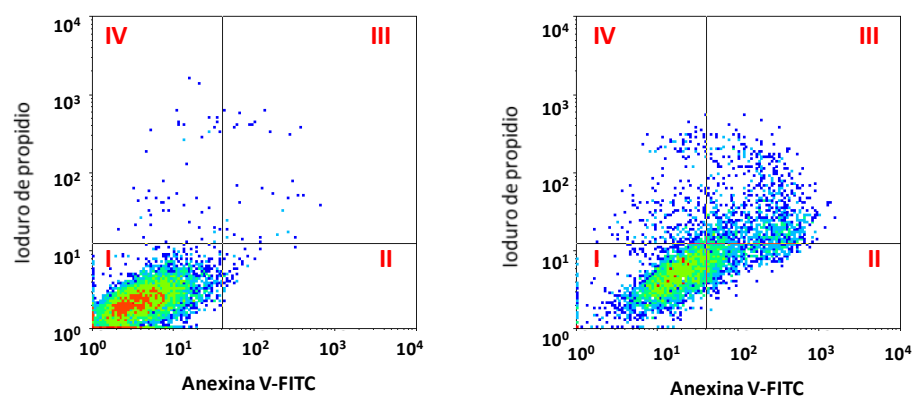
En resumen, este ensayo permite identificar cuatro poblaciones de células basadas en el marcaje positivo o negativo de AnexinaV-FITC e IP (Figura 13):

1) **Células vivas (cuadrante I)**, no presentan traslocación de FS y tienen la membrana íntegra (AnexinaV-FITC negativo, IP negativo). Dichas células emitirán niveles muy bajos o nulos de fluorescencia.

2) **Células apoptóticas tempranas (cuadrante II)**, han traslocado FS pero tienen aún su membrana íntegra (AnexinaV-FITC positiva, IP negativo). Dichas células emitirán niveles altos de fluorescencia verde debido al marcaje con AnexinaV-FITC.

3) **Células apoptóticas tardías (cuadrante III)**, han traslocado FS y tienen la membrana dañada (AnexinaV-FITC positiva, IP positivo). Dichas células emitirán niveles altos de fluorescencia roja y verde debido al marcaje con AnexinaV-FITC e IP.

4) **Células necróticas (cuadrante IV)**, han muerto directamente por necrosis, por lo que no han traslocado FS y presentan su membrana dañada (AnexinaV-FITC negativo, IP positivo). Dichas células emitirán niveles altos de fluorescencia roja debido al marcaje con IP.



**Figura 13: Efecto de AZD sobre la muerte celular utilizando el kit de de AnexinaV-FITC y IP.** En el cuadrante I se observan las células vivas, en el II, las células apoptóticas tempranas, en el III, las células apoptóticas tardías y en el IV, las células necróticas. Notar la redistribución de las células en los cuadrantes tras el tratamiento, indicando un aumento en el porcentaje de células apoptóticas tempranas y tardías.

Es importante mencionar que en el cuadrante III además de las células apoptóticas tardías (positivas para ambos fluoróforos), se pueden detectar también células que activaron el proceso de muerte celular programada por apoptosis, pero que llegado un momento, se agota su energía y activan el proceso de necrosis. Por tanto, este tipo de células al igual que las células apoptóticas tardías serán positivas para AnexinaV (pues se trasloca FS) y positivas para IP (pues se pierde la integridad de membrana).

Cabe mencionar que en las gráficas que corresponden al estudio de apoptosis mediante tinción con AnexinaV-IP, EL porcentaje (%) de muerte que se representa en el eje de las y, corresponde a la suma de los porcentajes de muerte de los cuadrantes II, III y IV, es decir, células apoptóticas tempranas (cuadrante II), células apoptóticas tardías (cuadrante III) y células necróticas (cuadrante IV). La decisión de incluir también a las células necróticas (aunque el porcentaje de éstas sea bajo) se debió a que el porcentaje de muerte obtenido mediante los experimentos de apoptosis fueron comparados con el porcentaje de muerte mediante los ensayos de ciclo celular (sería el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular. En este último, hemos considerado que el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo (indicativo de muerte) incluía tanto células apoptóticas como necróticas, teniendo en cuenta que ambos tipos de células sufren una fragmentación en su ADN y por tanto ambos tipos celulares se pueden encontrar en la fase SubG<sub>1</sub>.

Para llevar a cabo este estudio hemos empleado un kit de AnexinaV-FITC e IP (BD Pharmingen), que incluye AnexinaV-FITC, IP y un tampón que contiene Ca<sup>++</sup>, debido a que la unión de la AnexinaV a la FS es dependiente de calcio. Para este ensayo, las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos (Techno Plastic Products, TPP) y tratadas con el fármaco adecuado durante el tiempo correspondiente. Tras el tratamiento, las células fueron recolectadas por tripsinización, lavadas con PBS y centrifugadas a 1,500 rpm durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 10 µl de tampón y se añadieron 3 µl de AnexinaV-FITC y 5 µl de IP. Se dejó incubando 30-60 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo utilizando el software CellQuest (BD Biosciences) y el citómetro FACS Calibur (BD Biosciences, San Jose, California).

## Estadística

Las diferencias de las medias obtenidas en las diferentes condiciones experimentales se compararon utilizando el test estadístico de la  $t$  de Student en el programa GraphPad (GraphPad Software Inc., San Diego, CA).

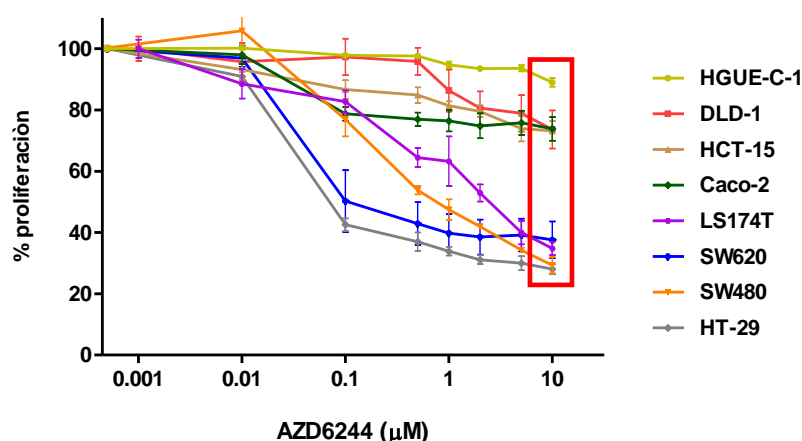


# RESULTADOS I



## 1) Efecto de AZD sobre la proliferación celular

Como primera aproximación a este estudio analizamos el efecto antiproliferativo de AZD sobre un panel de líneas celulares de adenocarcinoma de colon humanas. Como se muestra en la Figura 14, cuando las líneas celulares fueron tratadas con concentraciones de AZD entre 1 nM y 10 nM, se observa una inhibición de la proliferación menor al 20% en todas las líneas celulares. Sin embargo, a partir de concentraciones mayores de 100 nM, algunas líneas celulares son más sensibles que otras al tratamiento. Al tratar las células con concentraciones de AZD más elevadas (10  $\mu$ M) el perfil de respuesta es muy diferente y se distingue una población de células sensibles y otra población altamente resistente al tratamiento con AZD (Figura 14, recuadro rojo). En función de este resultado, las diferentes líneas celulares se han clasificado en sensibles y resistentes de acuerdo a su valor de  $IC_{50}$  (Tabla 4). Así, hemos considerado una línea celular resistente cuando su valor de  $IC_{50}$  es mayor de 1  $\mu$ M y sensible cuando su  $IC_{50}$  es menor de 1  $\mu$ M. En este contexto, las líneas celulares tumorales SW620, SW480, HT-29 y LS 174T se consideran sensibles a AZD, mientras que HGUE-C-1, Caco-2, HCT-15 y DLD-1 se consideran resistentes. Entre las células sensibles, las líneas celulares HT-29 y SW480 son las más afectadas por el tratamiento, alcanzándose una inhibición de  $71,97 \pm 1,68\%$  y  $70,69 \pm 2,63\%$ , respectivamente al ser tratadas con una concentración de AZD 10  $\mu$ M. Por otra parte, la línea más resistente es la línea celular HGUE-C-1, en la que una concentración 10  $\mu$ M de AZD reduce tan solo en un  $11,01 \pm 1,39\%$  la proliferación celular.



**Figura 14: Efecto de AZD sobre la proliferación celular en líneas celulares de adenocarcinoma de colon humanas.** Las células fueron sembradas en placas y tratadas con medio conteniendo concentraciones crecientes de AZD (1 nM-10  $\mu$ M), durante 72 horas. La proliferación celular fue determinada mediante el método de MTT, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. Cada punto representa el promedio de la proliferación  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de diferentes experimentos ( $n \geq 6$ ).



Efecto de AZD6244 sobre la proliferación celular		
Línea celular	IC <sub>50</sub> (μM)	% Inhibición (10 μM)
HT-29	0,033	71,97±1,68
SW620	0,121	62,35±5,96
SW480	0,422	70,69±2,63
LS 174T	0,771	62,21±2,18
Caco-2	>1	26,16±3,85
HCT-15	>1	26,87±3,21
DLD-1	>1	26,37±6,23
HGUE-C-1	>1	11,01±1,39

**Tabla 4: Valores de IC<sub>50</sub> e inhibición de la proliferación celular por AZD en líneas celulares de adenocarcinoma de colon humanas.** En la tabla se muestran los valores de IC<sub>50</sub> (μM) obtenidos para cada línea celular (de acuerdo con la gráfica de la Figura 14), así como el porcentaje de inhibición de la proliferación celular cuando las células son tratadas con una concentración 10 μM de AZD. En color rojo se muestran las líneas celulares sensibles y en color azul las líneas celulares resistentes a AZD de acuerdo a la clasificación definida en el texto. El porcentaje (%) de inhibición a 10 μM para cada línea celular representa el promedio de al menos 3 experimentos ± SEM. Cada experimento se realizó por sextuplicado (n=6).

## 2) Efecto de AZD sobre la formación de colonias en agar blando

El agar blando permite la proliferación independiente de anclaje de las células, característica exclusiva de las células que se han transformado en células tumorigénicas. En este tipo de ensayos, las células crecen formando colonias en ausencia de estímulos tanto internos como externos. Se evaluó la actividad de AZD en el crecimiento de las líneas celulares en estas condiciones. Para este estudio, realizado en colaboración con M<sup>a</sup> Angeles Ros y Elena Tristante de la Unidad AECC de Investigación Traslacional en Cáncer, se seleccionaron dos líneas sensibles (HT-29 y LS 174T) y dos líneas resistentes (DLD-1 y HCT-15) a AZD. Como se muestra en la Tabla 5, al tratar las líneas sensibles HT-29 y LS 174T con una concentración de AZD 100 nM, la formación de colonias se reduce a un 41,6±4,6% y 43,3±5,1% respecto al control (100%), respectivamente. Al aumentar la concentración de AZD a 1 μM, el efecto sobre la formación de colonias en las líneas celulares HT-29 y LS 174T es más drástico, ya que la formación de colonias queda reducida al 1,2±0,2% y 19,0±5,0%, respectivamente. Es decir, que a una concentración de 1 μM, el efecto de AZD es mayor en la línea celular HT-29 que en la línea celular LS 174T, lo que corrobora el resultado anterior obtenido por MTT (Figura 14). Sin embargo, en las líneas resistentes DLD-1 y HCT-15 (Tabla 5) una concentración 100 nM de AZD no disminuye la formación de colonias, comparado con la condición control. Por otra parte, cuando estas células son tratadas con una concentración mayor de AZD (1 μM) se observa una pequeña disminución en la capacidad de formación de colonias que se reduce al 70,4±6,3% y

76,3±8,1% respectivamente. Este resultado corrobora los resultados obtenidos por MTT, que muestra una elevada resistencia de estas líneas celulares al tratamiento con AZD (Figura 14).

	RESISTENTES		SENSIBLES	
	DLD-1	HCT-15	LS 174T	HT-29
Control	97,2 ± 9,9	97,1 ± 6,2	100 ± 23,4	100 ± 4,5
AZD 100 nM	100 ± 8,3	100 ± 8,5	43,3 ± 5,1	41,6 ± 4,6
AZD 1µM	70,4 ± 6,3	76,3 ± 8,1	19,0 ± 5,0	1,2 ± 0,2

**Tabla 5: Efecto de AZD sobre la formación de colonias en líneas celulares de adenocarcinoma de colon.** Las células fueron resuspendidas en agar con el medio de cultivo adecuado y las concentraciones indicadas de AZD. Transcurridos 14 días se contaron el número de colonias mayores de 100 micras. El valor 100% corresponde al mayor de los obtenidos en la formación de colonias dentro de cada línea celular. Cada valor representa la media obtenida de al menos 3 experimentos independientes  $n \geq 3 \pm$  SEM.

### 3) Efecto de AZD sobre el ciclo celular

Con el fin de investigar si los efectos antiproliferativos y antitumorales de AZD en las células sensibles es causado por un bloqueo en la proliferación celular o por inducción de muerte celular, decidimos realizar un estudio de ciclo celular tras el tratamiento con AZD. Para ello, las células sensibles y resistentes fueron tratadas con 1 µM de AZD durante 24, 48 y 72 horas, y recolectadas para el posterior análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo. Como se observa en la Tabla 6 y Figura 15, cuando las líneas celulares sensibles son tratadas con el inhibidor, se produce una clara acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, lo que conlleva a una disminución en la proporción de células en las fases S y G<sub>2</sub>/M (Tabla 6, números en rojo). El efecto de acumulación es máximo tras 24 horas de tratamiento en las líneas celulares SW620, SW480 y HT-29, produciéndose una acumulación del 37%, 18,2% y 17,1%, respectivamente. Sin embargo, en la línea sensible LS 174T, el efecto máximo de acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> ocurre tras 48 horas de tratamiento. En todos los casos, el efecto de acumulación comienza a remitir a las 72 horas de tratamiento con AZD. Cabe mencionar que si bien en algunos casos se ha detectado un aumento de la fase SubG<sub>1</sub> (indicativo de muerte), este efecto es mínimo y menor comparado con el efecto de acumulación en la fase G<sub>1</sub> del ciclo. En conjunto, estos resultados indican que AZD, a la concentración utilizada (1 µM), ejerce su efecto antiproliferativo de forma predominantemente citoestática, produciendo un bloqueo en la proliferación celular.

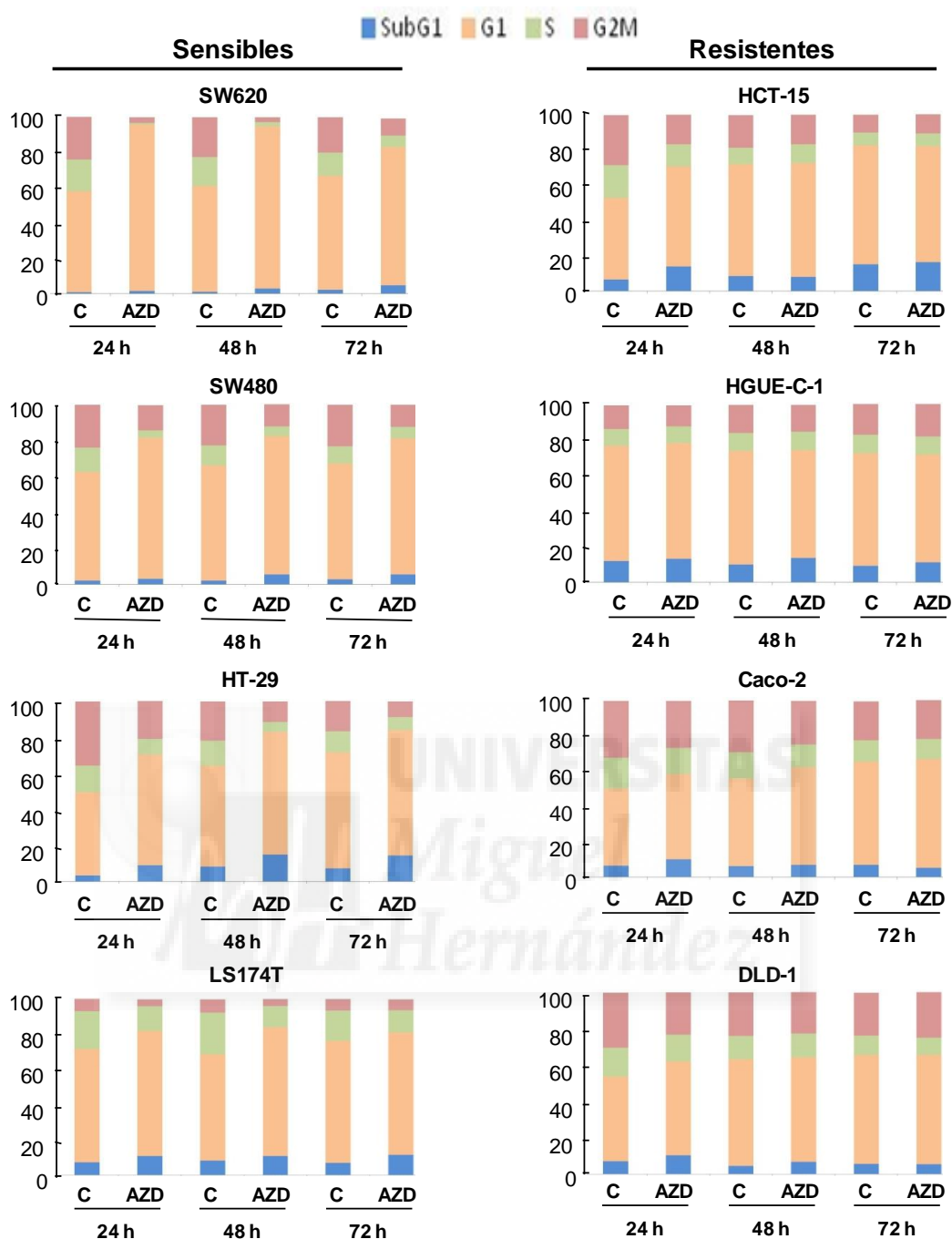
SW620	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	0,9 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,2 ± 0,3	2,9 ± 1,2	2,2 ± 1,3	4,8 ± 2,4
G <sub>1</sub>	<b>57,3 ± 0,5</b>	<b>94,3 ± 1,2</b>	<b>60,1 ± 0,5</b>	<b>91,2 ± 3,6</b>	<b>64,7 ± 3,3</b>	<b>78,4 ± 2,7</b>
S	17,9 ± 0,6	0,8 ± 0,1	16,4 ± 0,8	2,1 ± 0,7	13,2 ± 1,0	6,3 ± 0,1
G <sub>2</sub> /M	24,0 ± 0,1	3,2 ± 1,1	22,6 ± 1,1	2,9 ± 0,7	20,1 ± 0,8	9,7 ± 0,4
SW480	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	2,0 ± 0,2	3,1 ± 0,5	2,0 ± 0,1	5,4 ± 0,3	2,7 ± 0,2	5,4 ± 1,1
G <sub>1</sub>	<b>60,5 ± 2,1</b>	<b>78,7 ± 3,9</b>	<b>64,5 ± 1,4</b>	<b>77,2 ± 3,1</b>	<b>64,9 ± 1,7</b>	<b>75,8 ± 4,8</b>
S	13,6 ± 1,1	4,0 ± 0,8	11,1 ± 0,9	5,4 ± 0,2	9,5 ± 0,3	6,5 ± 1,0
G <sub>2</sub> /M	23,8 ± 0,7	14,1 ± 2,7	22,7 ± 2,0	12,1 ± 2,8	23,3 ± 1,4	12,3 ± 3,1
HT-29	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	3,3 ± 0,1	9,1 ± 3,6	8,4 ± 2,0	14,8 ± 2,7	7,3 ± 0,9	14,4 ± 0,1
G <sub>1</sub>	<b>44,3 ± 9,7</b>	<b>61,4 ± 4,2</b>	<b>55,9 ± 3,4</b>	<b>68,3 ± 2,6</b>	<b>64,4 ± 0,8</b>	<b>69,6 ± 1,0</b>
S	14,5 ± 1,2	8,6 ± 0,9	13,8 ± 1,2	5,3 ± 0,3	11,5 ± 0,3	7,1 ± 0,3
G <sub>2</sub> /M	34,2 ± 12,7	20,9 ± 3,9	21,9 ± 2,1	11,5 ± 1,7	16,9 ± 0,1	8,8 ± 1,0
LS 174T	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	7,2 ± 1,7	10,9 ± 0,3	8,2 ± 0,1	10,8 ± 0,5	7,0 ± 1,6	11,6 ± 2,1
G <sub>1</sub>	<b>64,4 ± 0,5</b>	<b>71,1 ± 1,2</b>	<b>60,5 ± 0,8</b>	<b>73,3 ± 1,1</b>	<b>69,2 ± 0,6</b>	<b>69,6 ± 2,2</b>
S	21,5 ± 1,0	14,0 ± 0,2	23,8 ± 1,5	12,1 ± 0,7	17,4 ± 0,4	12,6 ± 0,2
G <sub>2</sub> /M	7,0 ± 0,1	4,0 ± 0,7	7,5 ± 0,2	3,8 ± 0,1	6,4 ± 0,5	6,2 ± 0,3

**Tabla 6: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular (SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M) en las líneas celulares sensibles.** En la tabla se muestra el porcentaje promedio ± SEM de la distribución de ADN en las distintas fases del ciclo celular, correspondiente al tratamiento de las diversas líneas celulares con el inhibidor AZD (n≥6).

A continuación realizamos el mismo tipo de estudio en las líneas celulares resistentes. Como se observa en la Figura 15 y Tabla 7, cuando las líneas celulares HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 fueron tratadas con 1 μM de AZD, no se observa bloqueo en ninguna de las fases del ciclo celular. Es interesante notar que en la línea resistente HCT-15 se produce un aumento en la fase G<sub>1</sub> y SubG<sub>1</sub> tras 24 horas de tratamiento (marcado en rojo). Sin embargo, tras 48 horas la acumulación en dichas fases desaparece, las células logran progresar a las fases S y G<sub>2</sub>/M y el perfil de ciclo celular permanece inalterado respecto a la condición control.

HCT-15	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	6,5 ± 2,2	14,0 ± 2,2	8,4 ± 1,4	8,1 ± 3,2	15,2 ± 5,9	16,5 ± 6,1
G <sub>1</sub>	47,0 ± 1,5	56,9 ± 2,1	63,8 ± 2,3	64,7 ± 4,7	67,8 ± 1,1	65,9 ± 1,3
S	18,7 ± 0,1	12,7 ± 0,5	9,3 ± 0,3	10,7 ± 2,8	7,1 ± 0,7	7,2 ± 0,3
G <sub>2</sub> /M	28,3 ± 1,0	16,8 ± 0,1	18,7 ± 0,4	16,9 ± 4,7	10,2 ± 2,9	10,8 ± 4,1
HGUE-C-1	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	12,0 ± 1,9	13,3 ± 1,5	10,1 ± 0,4	13,7 ± 1,1	9,4 ± 0,4	11,3 ± 0,7
G <sub>1</sub>	65,3 ± 1,4	65,4 ± 1,4	64,0 ± 0,7	61,0 ± 0,6	63,6 ± 0,6	60,9 ± 0,9
S	9,2 ± 0,3	9,4 ± 0,3	10,2 ± 0,6	10,2 ± 0,3	10,5 ± 0,2	10,2 ± 0,1
G <sub>2</sub> /M	13,4 ± 0,7	11,9 ± 0,7	15,7 ± 0,9	15,2 ± 0,4	17,2 ± 0,4	18,4 ± 0,1
Caco-2	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	6,5 ± 0,6	10,1 ± 2,7	6,3 ± 1,6	7,1 ± 2,0	7,0 ± 0,2	5,3 ± 1,8
G <sub>1</sub>	43,8 ± 0,1	48,4 ± 2,7	49,7 ± 1,0	55,5 ± 1,7	58,7 ± 0,1	61,9 ± 0,9
S	17,6 ± 0,1	14,8 ± 0,4	14,9 ± 0,3	12,8 ± 1,1	12,1 ± 1,4	11,3 ± 0,1
G <sub>2</sub> /M	32,1 ± 0,4	26,4 ± 0,4	29,5 ± 2,4	24,7 ± 1,8	22,1 ± 1,2	22,3 ± 0,7
DLD-1	24h		48h		72h	
	Control	AZD	Control	AZD	Control	AZD
SubG <sub>1</sub>	6,5 ± 0,3	10,0 ± 1,5	4,3 ± 0,9	6,5 ± 1,0	5,2 ± 0,9	5,0 ± 0,9
G <sub>1</sub>	43,1 ± 3,4	50,3 ± 4,2	55,3 ± 7,1	55,1 ± 5,9	55,1 ± 1,9	54,3 ± 5,9
S	14,5 ± 2,3	14,2 ± 2,0	12,1 ± 1,93	12,3 ± 1,6	9,7 ± 2,0	8,4 ± 1,2
G <sub>2</sub> /M	28,0 ± 1,5	22,5 ± 1,3	22,5 ± 2,85	21,6 ± 2,4	21,8 ± 0,8	22,6 ± 1,1

**Tabla 7: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular (SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>/M) en las líneas celulares resistentes. En la tabla se muestra el porcentaje promedio ± SEM de la distribución de ADN en las distintas fases del ciclo celular correspondiente al tratamiento de las diversas líneas celulares con el inhibidor AZD (n≥6).**

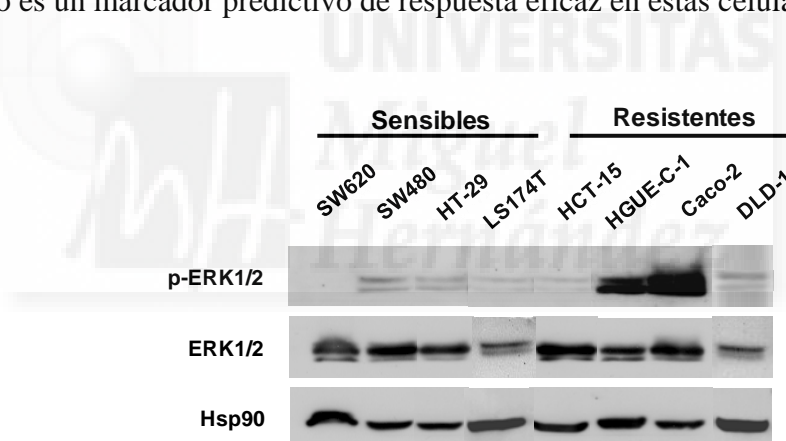


**Figura 15: Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular (SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>M).** Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon sensibles y resistentes fueron tratadas con 1  $\mu$ M AZD durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente se determinó la distribución del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular mediante citometría de flujo, tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

#### 4) Asociación entre los niveles basales de fosfo-ERK1/2 y resistencia a AZD

Los resultados obtenidos en los apartados anteriores permiten distinguir dos tipos de líneas celulares en base a la respuesta a AZD: líneas celulares sensibles y líneas resistentes. Con la finalidad de identificar posibles marcadores moleculares de resistencia a AZD, hemos

determinado si existe una relación entre los niveles basales de fosforilación de ERK1/2 en ausencia de suero y la resistencia a AZD (Figura 16). Este estudio se basa en la hipótesis de que las líneas celulares con elevada fosforilación y por tanto, elevada actividad de ERK1/2 dependen principalmente de la vía RAF/MEK/ERK para crecer y proliferar, por lo que serían más sensibles al inhibidor de MEK, AZD. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan esta idea, ya que ninguna de las líneas celulares sensibles a AZD presenta elevados niveles basales de fosfo-ERK1/2, tal y como ha sido postulado en otros trabajos. Por ejemplo, la línea celular SW620 es de las más sensibles a AZD (Tabla 4) y sin embargo presenta niveles indetectables de fosfo-ERK1/2. A su vez, la quinasa ERK1/2, se encuentra altamente fosforilada en las líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y Caco-2. Como se puede apreciar en la Figura 16, los niveles elevados de fosforilación de ERK1/2 en las líneas HGUE-C-1 y Caco-2 no son debidos a niveles altos de proteína total, lo que sugiere una mayor actividad de esta quinasa en estas células. A su vez, las líneas celulares resistentes restantes (DLD-1 y HCT-15) presentan una mínima activación constitutiva de ERK1/2. Estos resultados, en conjunto sugieren que el grado de activación basal de ERK1/2 no es un marcador predictivo de respuesta eficaz en estas células.



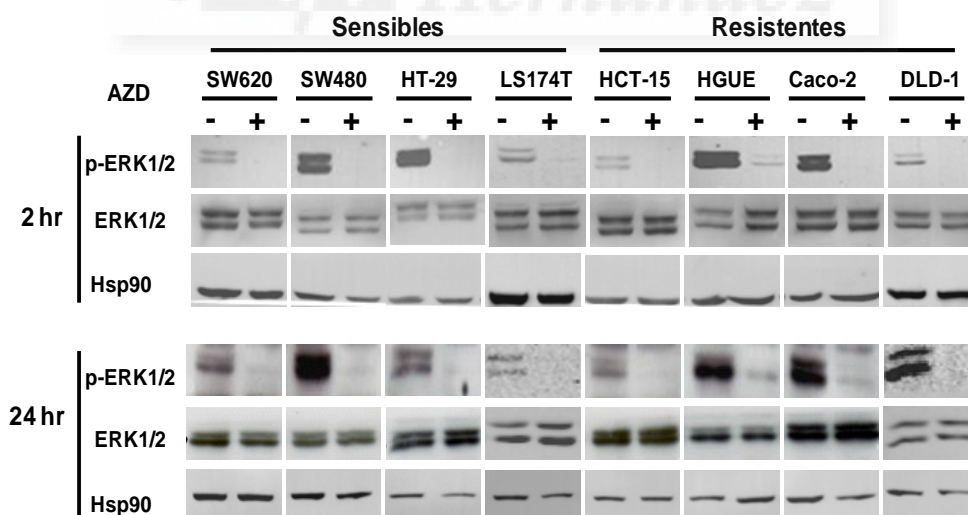
**Figura 16: Estado de fosforilación basal de la quinasa ERK1/2 en las líneas celulares sensibles y resistentes a AZD.** Las células fueron deprivadas de suero al incubarlas con medio de cultivo conteniendo suero bovino fetal al 0,1% durante 48 horas. Transcurrido este tiempo los extractos proteicos fueron analizados por Western blot con los anticuerpos dirigidos a la forma fosforilada y total de ERK1/2. En la figura se muestra un Western blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). La proteína Hsp90 se utilizó como control de carga.

### 5) Relación entre el grado de inhibición de ERK1/2 y la resistencia a AZD

Nuestro siguiente objetivo consistió en determinar si el grado de inhibición de ERK1/2 por AZD podría ser un determinante de resistencia al tratamiento, basados en la hipótesis de que AZD fuese capaz de inhibir MEK1/2 en las líneas celulares sensibles pero no en las resistentes.

Para ello, analizamos los niveles de fosfo-ERK1/2 en todas las líneas celulares tras el tratamiento con AZD (Figura 17). De forma interesante, tras 2 horas de tratamiento, los niveles ERK1/2 fosforilada disminuyen de la misma forma tanto en las células sensibles como en las resistentes (Figura 17, 2hr). Cabe destacar que en las líneas sensibles SW480 y HT-29, donde los niveles de fosfo-ERK1/2 son notablemente elevados, la fosforilación disminuye a niveles mínimos tras el tratamiento con AZD. Estos resultados indican que la fosforilación de ERK1/2, la diana directa de la quinasa MEK1/2, es inhibida por AZD tanto en células sensibles como resistentes, independientemente del tipo de respuesta a AZD obtenido mediante ensayos de MTT, agar blando y análisis del ciclo celular.

Otra posibilidad que podría explicar la resistencia al tratamiento podría ser que AZD ejerciera un efecto a corto plazo en las líneas celulares resistentes y tuviera una mayor duración en las líneas celulares sensibles. Para abordar esta interrogante, investigamos qué ocurría con la actividad de MEK1/2 tras 24 horas de tratamiento con AZD. Así, observamos que AZD continúa ejerciendo su efecto inhibitorio en todas las líneas celulares sean éstas sensibles o resistentes tras 24 horas de tratamiento (Figura 17, 24 hr). Estos resultados, en conjunto, indican que AZD es capaz de inhibir a su diana MEK1/2 tras de 2 horas de tratamiento y se mantiene activo pasadas las 24 horas de tratamiento tanto en las células sensibles como resistentes, indicando que MEK no jugaría un papel en la resistencia a AZD.



**Figura 17: Efecto de AZD sobre la fosforilación de ERK1/2.** Las células se incubaron con (+) o sin (-) AZD 500 nM durante 2 horas y 24 horas. Los extractos proteicos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos anti-fosfo-ERK1/2 y ERK1/2 para determinar los niveles de proteína fosforilada y total, respectivamente. Los blots que se muestran son representativos de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). Como control de carga se utilizó la proteína Hsp90.



## **6) Asociación entre el estado mutacional de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* y resistencia a AZD**

Con la finalidad de investigar si la resistencia a AZD se encuentra asociada a alteraciones genéticas, realizamos estudios en colaboración con el Dr. Pablo Carbonell, adjunto a la Unidad de Genética Molecular, Centro de Bioquímica y Genética Clínica del Hospital de la Arrixaca de Murcia, para determinar el estado mutacional de los genes *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon sensibles y resistentes. En la Tabla 8 se muestra para cada línea celular, el tipo de mutación identificada en cada uno de los genes en el exon indicado. En color rojo se muestran las líneas celulares sensibles y en color azul las células resistentes de acuerdo a la clasificación realizada anteriormente (Tabla 4). Cabe mencionar que los datos del estado mutacional de cada gen obtenidos por el Dr. Carbonell, coinciden con la información consultada en la literatura y con los datos de la base de datos Cosmic del Instituto Sanger (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>).

Los resultados de este estudio indican que no existe una asociación simple entre el estado mutacional en el gen *PIK3CA* (exones 9 y 20) y la resistencia a AZD, ya que tanto líneas celulares resistentes como sensibles presentan mutaciones en este gen (Tabla 8) y tanto líneas celulares resistentes como sensibles no presentan ningún tipo de mutación en el gen *PIK3CA*. La presencia de mutaciones en el gen *KRAS* tampoco parece estar asociada al destino de las células frente al tratamiento con AZD, ya que las células que presentan dicha mutación responden de forma variable al tratamiento. Estudios previos revelan que la mutación *V660E* en el gen *BRAF* se asocia con una mayor sensibilidad a inhibidores de MEK1/2 (Solit et al., 2006). La mutación *V660E* consiste en una mutación puntual que produce una sustitución de Val a Glu en el aminoácido 600 de la proteína BRAF y se ha descrito que este tipo de mutación es la más frecuente en tumores. En nuestro estudio, no hemos detectado una relación clara entre la mutación *V660E* y la respuesta a AZD. Si bien la línea celular con mayor sensibilidad a AZD (HT-29) presenta la mutación *V600E*, las restantes líneas celulares sensibles a AZD no exhiben dicha mutación (Tabla 8).

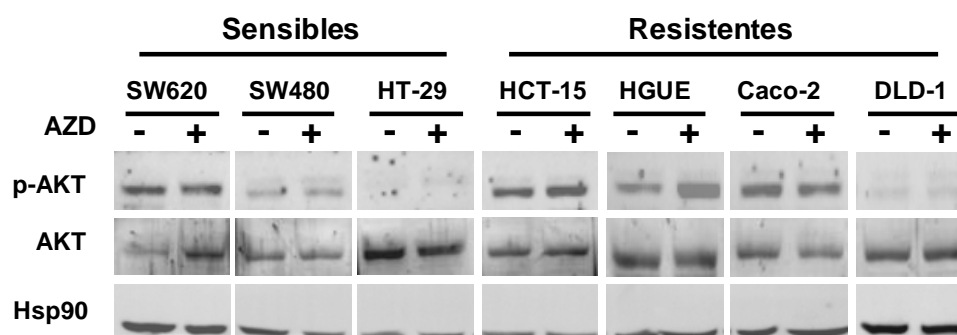


Estado mutacional			
Línea celular	<i>KRAS</i> (exon 1)	<i>BRAF</i> (exon 15)	<i>PIK3CA</i> (exon 9 & 20)
HT-29	Salvaje	p.V600E	p.P449T
SW620	p.G12V	Salvaje	Salvaje
SW480	p.G12V	Salvaje	Salvaje
LS 174T	p.G12D	Salvaje	p.H1047R
CaCo-2	Salvaje	Salvaje	Salvaje
HCT-15	p.G13D	Salvaje	p.E545K/D549N
DLD-1	p.G13D	Salvaje	p.E545K/D549N
HGUE-C-1	Salvaje	Salvaje	Salvaje

**Tabla 8: Estado mutacional de los genes *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* en líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon.** En la tabla se muestra el tipo de mutación identificada en el exon indicado para cada gen (*KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*) en cada línea celular. En el caso de no identificarse ninguna mutación en el exon indicado, se hace referencia al mismo como gen salvaje. En rojo se muestran las líneas celulares sensibles y en color azul las células resistentes.

### 7) Efecto de AZD sobre la fosforilación de AKT, p70S6K y RPS6

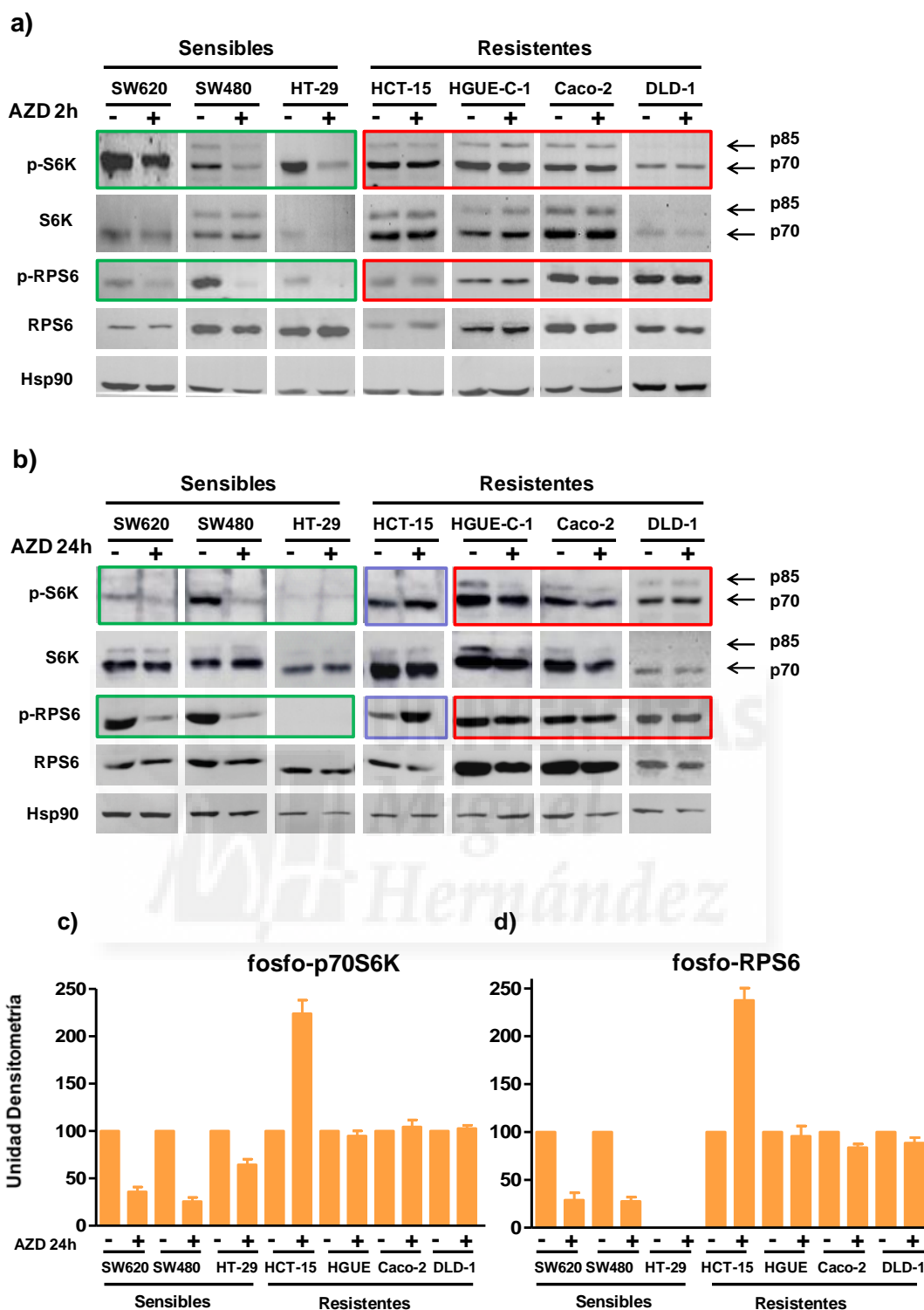
Nuestro siguiente objetivo consistió en explorar si la resistencia a AZD podría estar asociada a la inhibición de la fosforilación de moléculas clave de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. Para abordar este estudio, realizamos experimentos de Western blot para determinar las formas totales y fosforiladas de AKT, p70S6K y RPS6 en respuesta a AZD. Como se muestra en la Figura 18, al incubar las células durante 2 horas con AZD, los niveles de fosforilación de AKT no se ven afectados en ninguna de las líneas celulares, lo que indicaría que AZD no es capaz de inhibir la actividad de esta quinasa en líneas celulares sensibles ni resistentes y por tanto, la activación de dicha molécula no sería relevante en la resistencia.



**Figura 18: Efecto de AZD sobre la fosforilación de AKT.** Las líneas celulares sensibles y resistentes fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de AZD 500 nM durante 2 horas. Posteriormente, se obtuvieron los extractos proteicos que fueron analizados mediante Western blot con los anticuerpos indicados en la figura. La proteína Hsp90 fue utilizada como control de carga. En la figura se muestra un Western blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ).

Sin embargo, el análisis del efecto de AZD sobre la inhibición de p70S6K y de RPS6 resultó bastante interesante (Figura 19). En este caso, se observa que tras 2 horas de tratamiento, AZD tiene un gran impacto sobre la fosforilación de p70S6K y RPS6 en las células sensibles (SW620, SW480 y HT-29), ya que los niveles de fosforilación disminuyen notoriamente en las células tratadas respecto a las células control (Figura 19a, recuadros verdes). La inhibición de la fosforilación de p70S6K y RPS6 es especialmente notable en las líneas celulares sensibles HT-29 y SW480, respectivamente. De forma interesante, en las líneas resistentes HCT-15, HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 no se aprecia un cambio significativo en el estado de fosforilación de p70S6K y RPS6 tras el tratamiento con AZD (Figura 19a, recuadros rojos). Este resultado estaría indicando que AZD inhibe la actividad de la quinasa p70S6K y de la proteína RPS6 en las líneas sensibles pero no logra inhibir su actividad en las líneas celulares resistentes.

A continuación quisimos investigar si este patrón de respuesta se mantenía tras 24 horas de tratamiento con AZD (Figura 19b). De manera similar, se observa una disminución de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6 en las líneas celulares sensibles tras 24 horas de tratamiento (Figura 19b, recuadros verdes). Sin embargo, el tratamiento de las células resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 no conduce a una disminución de la fosforilación de estas proteínas (Figura 19b, recuadros rojos). Curiosamente, en la línea celular resistente HCT-15 se observa un comportamiento diferente. En este caso, el tratamiento a largo plazo con AZD (24 horas) conduce a un aumento marcado en niveles de fosforilación de la quinasa p70S6K y de RPS6 (Figura 19b, recuadros azules). En los análisis de densitometría (Figuras 19c y d) se observa claramente que tras 24 horas de tratamiento con AZD no se alteran los niveles de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6 en las líneas resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 y que la fosforilación de estas proteínas incluso aumenta en la línea celular HCT-15.

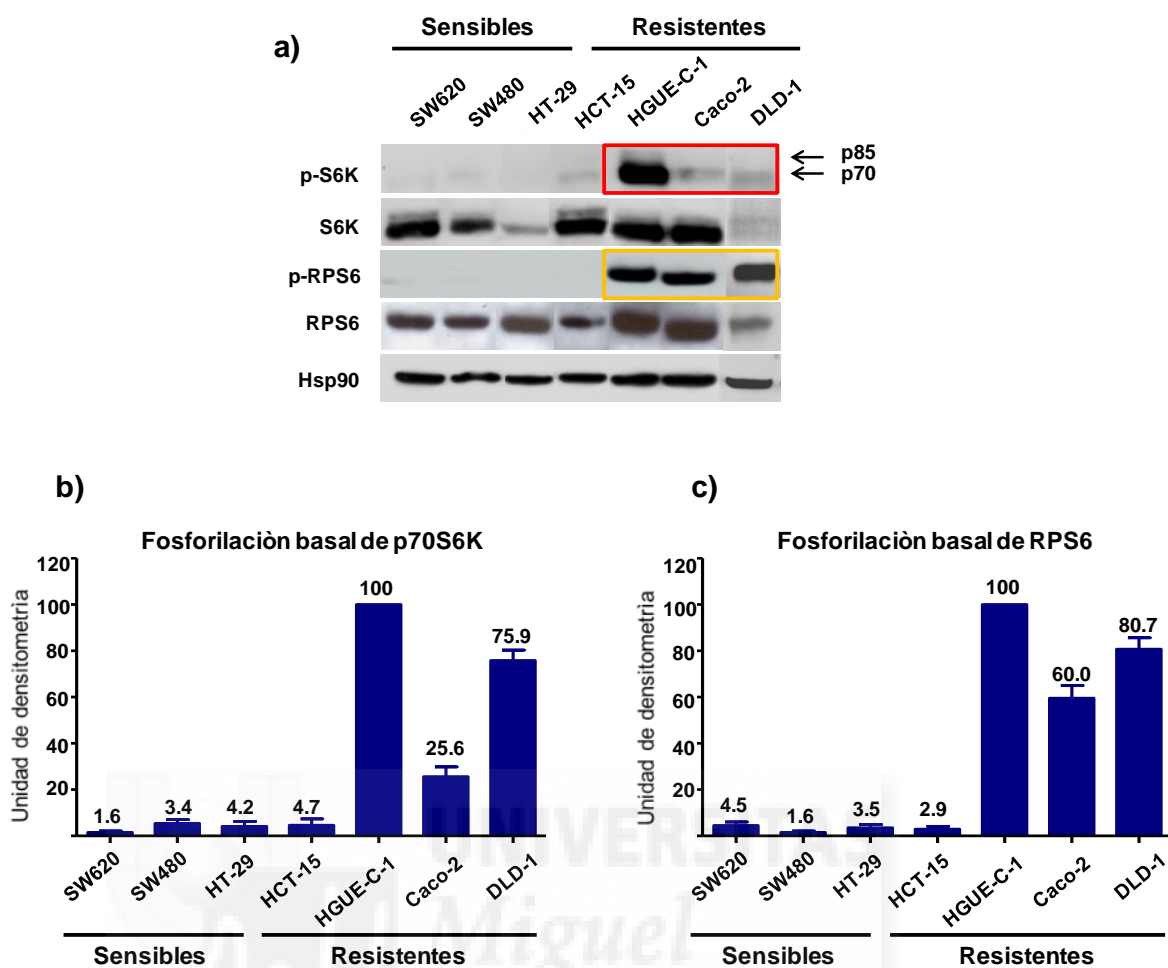


**Figura 19: Efecto de AZD sobre la fosforilación de S6K1 y RPS6.** Las líneas celulares sensibles y resistentes fueron incubadas en presencia (+) o ausencia (-) de AZD 500 nM durante 2 horas (a) o 24 horas (b). Los extractos de proteína fueron analizados por Western blot para determinar los niveles de proteína total y fosforilada. La proteína Hsp90 fue utilizada como control de carga. En la figura se muestran blots representativos de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). (c, d) **Densitometría.** Los gráficos de barras representan los niveles de proteína fosforilada en relación a los niveles de proteína total en presencia (+) o ausencia (-) de AZD. Los valores de densitometría fueron obtenidos tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. El valor de cada columna representa el promedio de al menos tres análisis de densitometría  $\pm$  el error estándar de la media ( $n \geq 3$ ).

### **8) Las líneas celulares resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 presentan niveles basales elevados de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6**

En resumen, los resultados presentados en el apartado anterior revelan que el tratamiento con AZD (a tiempos cortos o largos) no altera los niveles de fosfo-p70S6K ni de fosfo-RPS6 en las líneas resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 e incluso los niveles de estas proteínas aumentan en el caso de la línea celular resistente HCT-15. Una hipótesis razonable sería que en estas células, p70S6K y RPS6 estén activadas de manera constitutiva y esta elevada actividad endógena fuera responsable de la falta de inhibición de la fosforilación tras el tratamiento con AZD. Para explorar esta idea, se analizó el estado de fosforilación basal de estas proteínas en las líneas celulares sensibles y resistentes (Figura 20). Para ello, las células fueron incubadas en medio de cultivo con niveles muy bajos de suero bovino fetal (0,1%) durante 48 horas y posteriormente se obtuvieron los extractos de proteína para evaluar los niveles de fosforilación de p70S6K y RPS6. La incubación de las células en condiciones de privación de suero evita la presencia en el medio de cultivo de factores de crecimiento que se podrían unir a los receptores en la superficie de las células, activando diversas rutas de señalización incluyendo las vías PI3K y RAF/MEK/ERK. Los niveles de fosforilación de las proteínas en condiciones de privación de suero se deben a la actividad endógena o constitutiva de estas proteínas en ausencia de factores de crecimiento y señales externas.

De manera interesante, las líneas celulares resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 expresan niveles de fosforilación basal más elevados de p70S6K y RPS6 (Figura 20a, recuadro rojo y recuadro mostaza, respectivamente) que las líneas celulares sensibles SW480, SW620 y HT-29, en las cuales los niveles de fosforilación basal resultaron casi indetectables (Figura 20a, 20b y 20c). La fosforilación constitutiva de p70S6K y RPS6 es particularmente elevada en la línea celular resistente HGUE-C-1. Curiosamente, la línea resistente HCT-15 presenta niveles mínimos de fosforilación basal de p70S6K y RPS6, similares a los niveles existentes en las líneas celulares sensibles (Figura 20a, 20b y 20c). Estos resultados, sugieren que la resistencia a AZD podría estar asociada a un aumento en la fosforilación/activación basal de las proteínas p70S6K y RPS6 en las líneas celulares HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1. Sin embargo, en la línea HCT-15 la fosforilación constitutiva de estas proteínas no parece ser responsable de la resistencia a AZD.

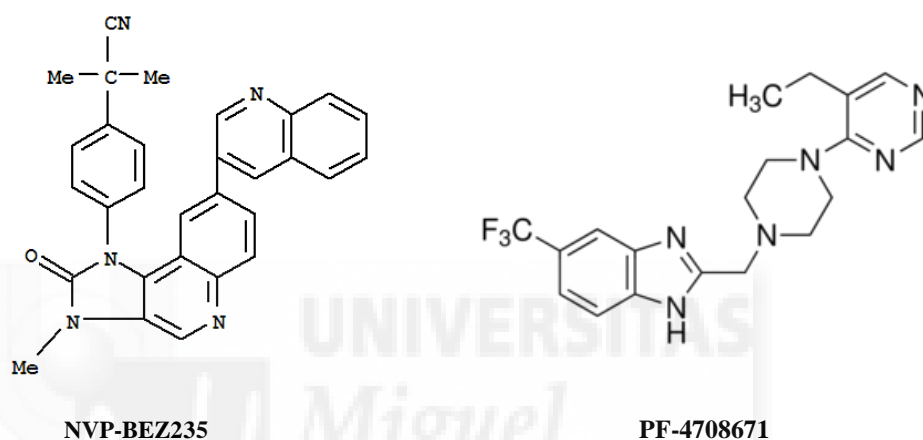


**Figura 20: Estado de fosforilación basal de p70S6K y RPS6 en las líneas celulares sensibles y resistentes a AZD.** Las células fueron incubadas en medio de cultivo conteniendo 0,1% de suero bovino fetal durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, se obtuvieron los extractos de proteína total para ser analizados por **Western blot (a)** con los anticuerpos dirigidos frente a las formas fosforilada y total de p70S6K y RPS6. En la figura se muestra un blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). La proteína Hsp90 se utilizó como control de carga. **(b, c) Densitometrías.** Los gráficos de barras representan la cantidad relativa de p70S6K y RPS6 fosforilada frente a la cantidad total de p70S6K y RPS6 en las líneas celulares sensibles y resistentes. Los valores de densitometría fueron obtenidos tal como se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

### 9) Reversión de la resistencia en HGUE-C-1, DLD-1 y HCT-15 por inhibición de p70S6K y RPS6

Los resultados previos plantean la posibilidad de que una activación basal elevada de la quinasa p70S6K y/o de la proteína RPS6 en las líneas celulares HGUE-C-1, DLD-1 y Caco-2 podría contribuir a la resistencia a AZD. En el caso de la línea celular HCT-15 la resistencia parecería estar asociada no a niveles basales elevados de estas proteínas sino a un aumento en la fosforilación de las mismas en respuesta a AZD. Para comprobar estas hipótesis, se exploró la posibilidad de combinar AZD con agentes inhibidores de p70S6K y RPS6 e investigar si dicha

combinación podría ser capaz de revertir la resistencia a AZD. En el caso de las líneas celulares HGUE-C-1, DLD-1 y Caco-2, los inhibidores bloquearían la activación basal de p70S6K y RPS6 y en el caso de la línea celular HCT-15, los inhibidores evitarían el aumento en la fosforilación de p70S6K y RPS6 que ocurre en respuesta a AZD. Cabe destacar, que hasta la fecha no existen inhibidores específicos de la proteína RPS6 comercialmente disponibles, y por ello, no hemos realizado experimentos de combinación de AZD e inhibidores de esta proteína. En su lugar, empleamos NVP-BEZ235, un inhibidor dual de PI3K/mTOR, que indirectamente inhibe p70S6K y RPS6 y el compuesto PF-4708671, un inhibidor específico de p70S6K (Figura 21).



**Figura 21: Estructura química de los compuestos NVP-BEZ235 y PF-4708671.**

NVP-BEZ235 (en adelante, BEZ) es un inhibidor dual de las quinasas PI3K y mTOR que ha mostrado bloquear también la actividad de sus moléculas efectoras, p70S6K y RPS6 en varios tipos de tumores (Baumann P et al., 2009; Masuda M et al., 2011). PF-4708671 es un inhibidor específico de p70S6K capaz de bloquear la fosforilación de RPS6 mediada por p70S6K.

### **a) Reversión de la resistencia por inhibición con BEZ**

En primer lugar se investigó si la combinación de AZD y BEZ era capaz de sensibilizar a las líneas celulares resistentes al tratamiento con AZD. Para este estudio, hemos utilizado las líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1 por ser las que presentan los niveles de fosforilación endógena más elevados de p70S6K y RPS6. Se utilizaron dos abordajes experimentales diferentes:

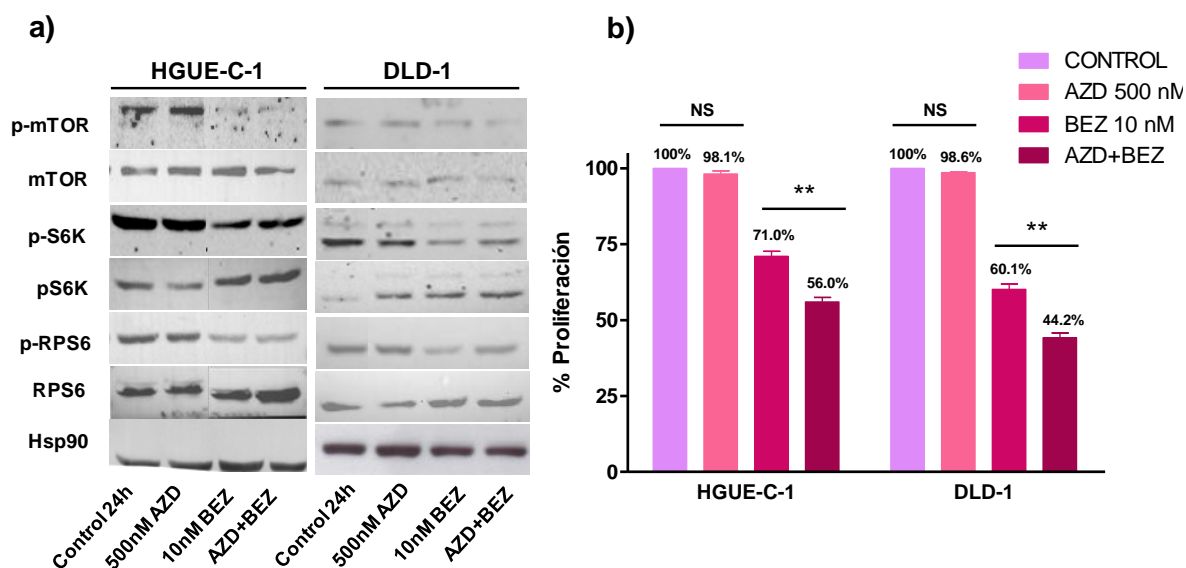
- i) Análisis de proliferación celular mediante el ensayo de MTT.
- ii) Análisis de ciclo celular por citometría de flujo.

### **i) Análisis de la reversión de resistencia mediante MTT**

En la Figura 22 se muestra el efecto de combinación de AZD y BEZ sobre la proliferación celular en las células HGUE-C-1 y DLD-1, utilizando el ensayo de proliferación celular MTT. Los experimentos control de Western blot confirman que BEZ suprime la fosforilación de su proteína diana mTOR en ambas líneas celulares (Figura 22a). Asimismo, BEZ disminuye la fosforilación de las proteínas efectoras p70S6K y RPS6, tanto en ausencia como en presencia de AZD, indicando que este compuesto es capaz de inhibir la actividad de estas proteínas en estas células (Figura 22a).

Una vez comprobado esto, se procedió a investigar si la combinación de AZD y BEZ era capaz de revertir la resistencia a AZD (Figura 22b). Como se observa, el tratamiento de las células HGUE-C-1 y DLD-1 con AZD exclusivamente, produce una inhibición de la proliferación menor del 2% ( $98,1 \pm 1,05\%$  y  $98,6 \pm 0,25\%$  de proliferación, respectivamente), lo que corrobora los resultados anteriores obtenidos por MTT y ciclo celular que muestran una elevada resistencia a AZD en estas células. Sin embargo, cuando AZD es usado en combinación con BEZ, las células HGUE-C-1 y DLD-1 se sensibilizan al tratamiento con AZD y la proliferación disminuye de forma significativa a un valor de  $56,0 \pm 1,42\%$  y  $44,2 \pm 1,56\%$ , respectivamente. Cabe mencionar que si bien BEZ utilizado de forma individual inhibe en cierto grado la proliferación en las células HGUE-C-1 y DLD-1 ( $71,0 \pm 1,61$  y  $60,1 \pm 1,78$ , respectivamente) cuando BEZ es utilizado en combinación con AZD, la disminución en la proliferación es significativamente mayor en comparación con el uso de BEZ de manera individual (Figura 22b).





**Figura 22: Efecto de AZD+BEZ (MTT) en líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1. a) Inhibición de la fosforilación de mTOR, p70S6K y RPS6.** Las células se trataron con AZD (500 nM) y/o BEZ (10 nM) durante 24 horas y los extractos de proteína total obtenidos fueron analizados por Western blot utilizando los anticuerpos correspondientes. **(b) Efecto de AZD+BEZ sobre la proliferación celular (MTT).** Las células fueron tratadas con AZD (500nM), BEZ (10nM) o una combinación de ambos (AZD+BEZ) durante 72 horas. La proliferación celular fue determinada mediante MTT, tal como se describe en Materiales y Métodos. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Test *t* de Student: NS: no significativo; \*\*  $p < 0,01$ .

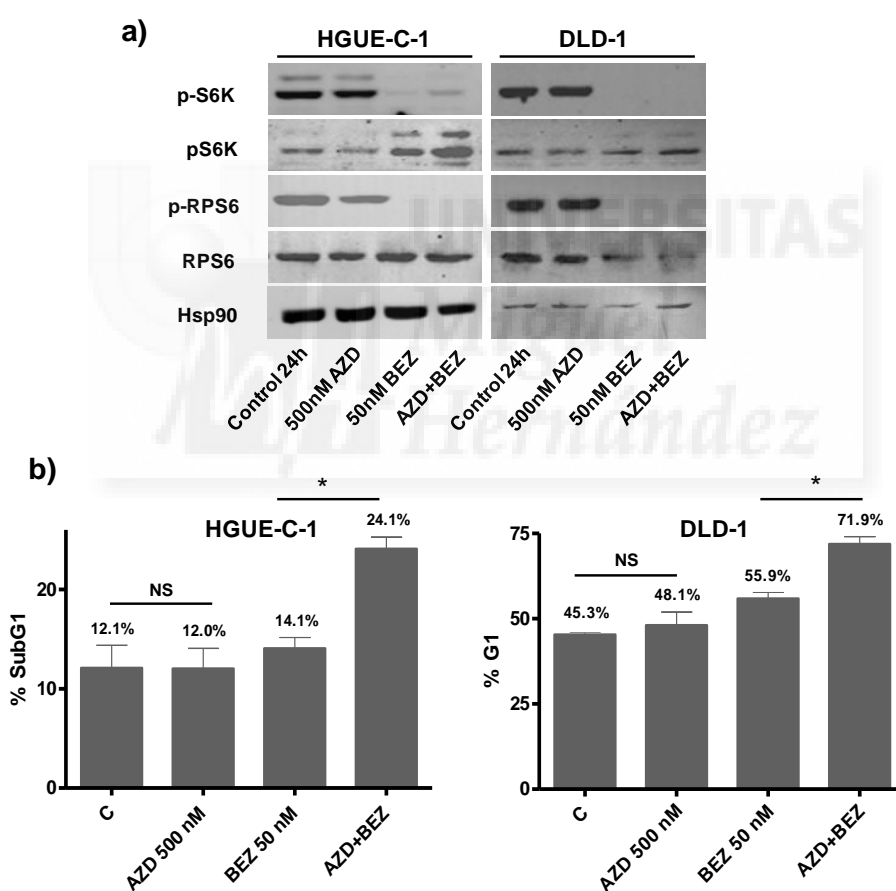
## ii) Análisis de la reversión de resistencia mediante el estudio del ciclo celular

A continuación realizamos estudios de ciclo celular para corroborar si la combinación de AZD+BEZ sensibiliza a las líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1 al tratamiento con AZD (Figura 23). Como era de esperar, los Western blot control muestran que BEZ utilizado a una concentración mayor de 50 nM (concentración a la cual se realizaron los estudios del ciclo celular) inhibe la fosforilación de las proteínas efectoras p70S6K y RPS6 prácticamente en su totalidad en ambas líneas celulares (Figura 23a).

Cabe mencionar que en los ensayos de ciclo celular, la incubación con AZD+BEZ en las células HGUE-C-1 y DLD-1 produce alteraciones en las fases SubG<sub>1</sub> y G<sub>1</sub>, respectivamente, por lo que en las gráficas se representa la fase del ciclo que se vio alterada en cada tipo celular tras el tratamiento (Figura 23b) (ver Discusión para más detalles). Hecha esta consideración procederemos a describir los resultados obtenidos. En el caso de la línea celular HGUE-C-1, en presencia de AZD no se produce un aumento en la fase SubG<sub>1</sub> (indicativo de muerte celular), tal y como se ha mostrado con los estudios de MTT y ciclo celular (Figura 14 y 15). Sin embargo, cuando las células son incubadas con AZD+BEZ el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub>



aumenta desde un valor del  $12,0 \pm 2,0\%$  (condición control) a un valor del  $24,1 \pm 1,2\%$ , quedando demostrado una vez más que el tratamiento simultáneo de AZD y BEZ, sensibiliza a las células a la acción de AZD. En la línea celular DLD-1, AZD utilizado de forma individual no muestra ningún tipo de efecto sobre las células, tal y como se ha mostrado en los apartados anteriores en los estudios de proliferación celular, agar blando y ciclo celular (Figuras 14 y 15). Sin embargo, la incubación de estas células con AZD+BEZ conduce a un bloqueo en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Cabe mencionar que si bien BEZ produce un aumento en la fase  $G_1$  del ciclo celular (de  $45,3 \pm 0,9$  en la condición control a  $55,9 \pm 1,8\%$ ), la incubación con AZD+BEZ produce una acumulación significativamente mayor ( $71,9 \pm 2,1\%$ ), lo que indicaría que BEZ sensibiliza a las células al tratamiento con AZD.

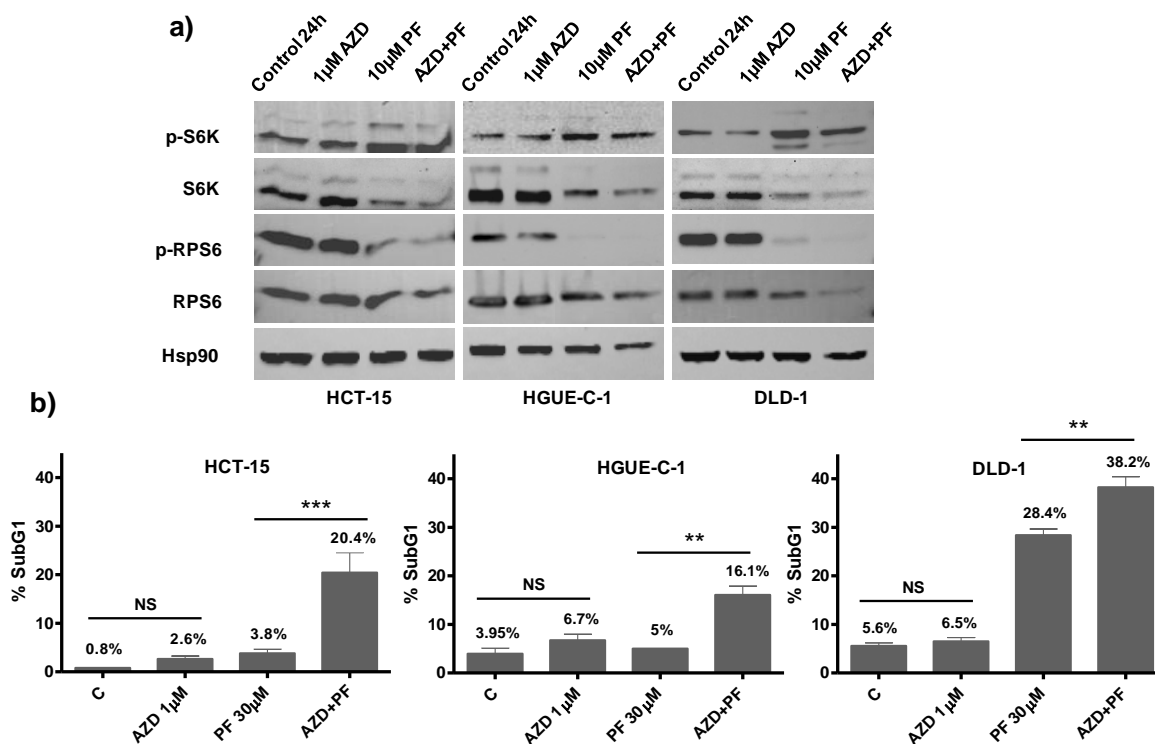


**Figura 23: Efecto de AZD+BEZ (ciclo celular) en líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y DLD-1. (a) Inhibición de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6.** Las células se incubaron con AZD (500 nM) y/o BEZ (50 nM) durante 24 horas y los extractos de proteína total fueron analizados por Western con los anticuerpos correspondientes. **(b) Efecto de AZD+BEZ sobre el ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD (500 nM) y/o BEZ (50nM) durante 24 horas y posteriormente se determinó el porcentaje de células en la fase Sub $G_1$  (HGUE-C-1) y  $G_1$  (DLD-1) del ciclo celular por citometría de flujo. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Test  $t$  de Student: NS: no significativo; \*  $p < 0.05$ .

## **b) Reversión de resistencia por inhibición con PF-4708671**

A continuación investigamos si ocurría reversión en la resistencia a AZD utilizando un inhibidor más específico de p70S6K, PF-4708671 (en adelante, PF). Para este estudio se utilizaron las líneas celulares HGUE-C-1, DLD-1 y HCT-15. Las células fueron incubadas en presencia de AZD y/o PF y posteriormente se realizaron ensayos de ciclo celular para determinar si se producía una reversión en la resistencia (Figura 24). En las gráficas se representa la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular debido a que PF produce muerte celular (aumento en fase SubG<sub>1</sub>) y no una acumulación en G<sub>1</sub> como ocurre con BEZ.

Los experimentos control de Western blot muestran que el tratamiento con PF a una concentración 10  $\mu$ M aumenta los niveles de fosforilación de su proteína diana, tal y como se describe en el trabajo de caracterización del inhibidor (Pearce et al., 2010) (ver Discusión para más detalles). Sin embargo, la inhibición de p70S6K queda demostrada por la disminución en los niveles de fosforilación de su proteína efectora más importante, la proteína RPS6 (Figura 24a). Los estudios de ciclo celular (Figura 24b) muestran que al tratar las líneas celulares HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1 con AZD 1  $\mu$ M, el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular permanece prácticamente invariable respecto a la condición control ( $2,6 \pm 0,6\%$ ,  $6,7 \pm 1,3\%$  y  $6,5 \pm 0,8\%$ , respectivamente). Asimismo, tampoco se observan cambios en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular en presencia de AZD exclusivamente (datos no mostrados). Sin embargo, cuando las células son incubadas en presencia de AZD+PF, el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular aumenta notoriamente en las tres líneas celulares, indicando que PF sensibiliza a las células frente al tratamiento con AZD. En el caso de la línea celular DLD-1, cabe notar que si bien el inhibidor PF utilizado de manera individual provoca un aumento de la fase SubG<sub>1</sub> ( $28,4 \pm 1,3\%$ ), la combinación de AZD+PF produce un aumento significativamente mayor del porcentaje de células en esta fase ( $38,2 \pm 2,2\%$ ), lo que indica que en presencia de PF, el compuesto AZD es capaz de promover la muerte de las células.



**Figura 24: Efecto de AZD+PF en líneas celulares resistentes HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1. (a) Efecto de AZD+PF sobre la inhibición de p70S6K y RPS6.** El Western blot muestra la inhibición de la fosforilación de RPS6. Las células fueron tratadas con AZD1  $\mu\text{M}$  y/o PF 10  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y los extractos proteicos se analizaron por Western blot. **(b) Efecto de AZD+PF sobre el ciclo celular.** Las células se trataron con AZD1  $\mu\text{M}$  y/o PF 30  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y posteriormente fueron procesadas para determinar el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular por citometría de flujo. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Test *t* de Student: NS: no significativo; \*\*  $p < 0.01$ .

## **RESULTADOS II**



En la primera parte de este trabajo de tesis hemos mostrado que la fosforilación constitutiva de la quinasa p70S6K y de su diana RPS6 podrían ser responsables, en parte, de la resistencia al tratamiento con AZD en las líneas resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1. Este mecanismo de resistencia ha sido observado en algunos tipos de tumores en los que se ha demostrado que la activación constitutiva de determinadas quinasas contribuye a la resistencia a la quimioterapia. Sin embargo, además de este mecanismo de resistencia, existen una diversidad de formas mediante las cuales una célula tumoral evade el tratamiento quimioterapéutico. En los últimos tiempos, se ha observado que la autofagia, un proceso fisiológico que ocurre en todas las células, desempeña un papel importante en la supervivencia de tumores. Cada día un mayor número de trabajos muestran que la autofagia es activada por las células tumorales para resistir el tratamiento quimioterapéutico, funcionando como un mecanismo protector. La segunda parte de este trabajo de tesis tuvo como finalidad investigar si AZD era capaz de inducir la autofagia en las líneas celulares de adenocarcinoma de colon sensibles y resistentes y de ser así, comprender que papel jugaría la autofagia frente al tratamiento con AZD.

En la primera sección de los resultados (Figura 14 y Tabla 4), hemos observado mediante ensayos de proliferación MTT que algunas líneas celulares son altamente resistentes al tratamiento con AZD, mientras que otras resultaron muy sensibles. Posteriormente, estudios de ciclo celular utilizando una concentración 1  $\mu\text{M}$  indican que este efecto antiproliferativo en las células sensibles se debe principalmente a un bloqueo en la fase  $G_1$  del ciclo, sin observarse grandes indicios de muerte celular (Figura 15).

Por otra parte, en la mayoría de los trabajos publicados, se ha demostrado que la autofagia se encuentra estrechamente relacionada con la muerte celular y no con un bloqueo en la proliferación. Parece ser que muchos tumores ponen en marcha la autofagia como mecanismo de resistencia a la quimioterapia y evitan así su muerte o por el contrario, la autofagia contribuye a la muerte del tumor. Por esta razón, antes de proceder a investigar si AZD induce autofagia en las líneas tumorales de colon, decidimos explorar si concentraciones de AZD mayores a 1  $\mu\text{M}$  provocaban la muerte celular en las líneas sensibles y resistentes. Para llevar a cabo éste y posteriores estudios, hemos seleccionado la línea celular resistente HGUE-C-1 y la línea celular sensible SW480.

### 1) Efecto de AZD sobre la muerte celular

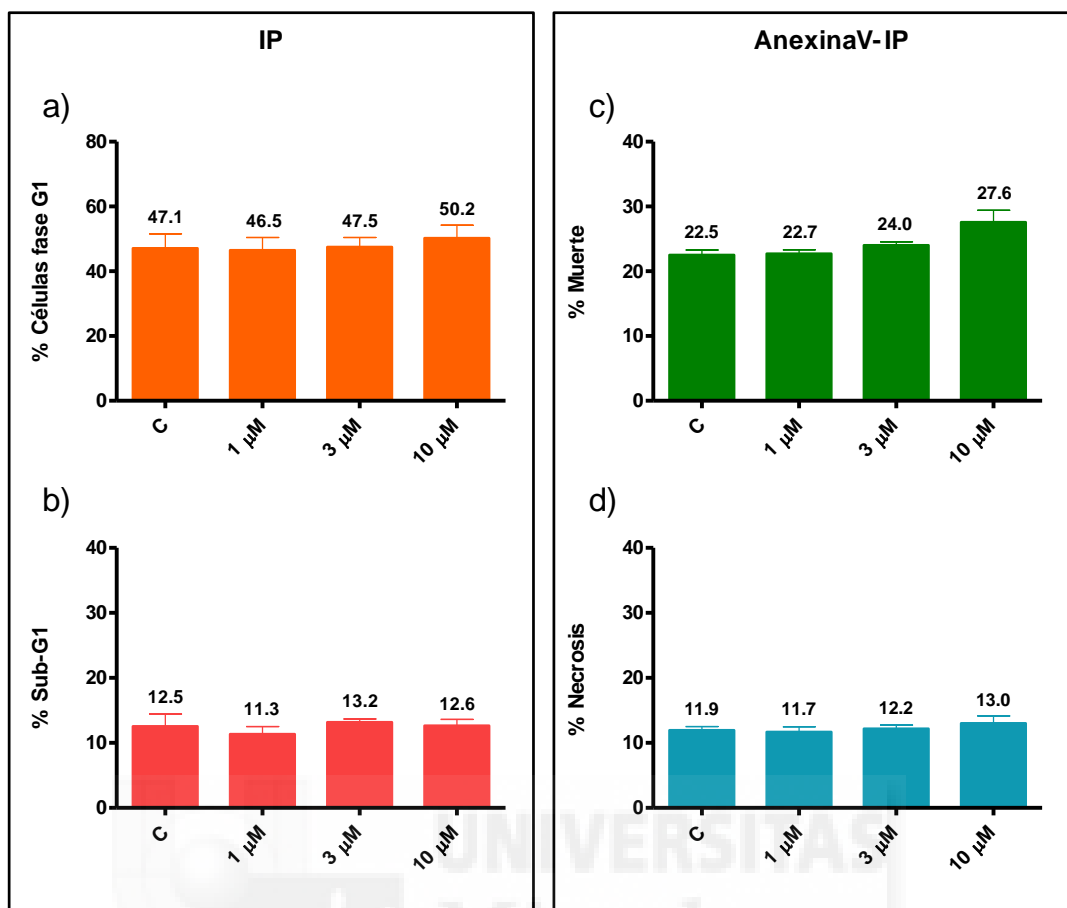
En primer lugar decidimos investigar el efecto de tres concentraciones de AZD, 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , sobre la muerte celular en la línea celular sensible SW480 y en la línea celular resistente HGUE-C-1. Para ello se emplearon dos ensayos diferentes:

i) El primero de ellos consistió en el estudio de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo empleando el fluoróforo Ioduro de Propidio (**IP**), tal y como se mostró en experimentos anteriores (Figura 15) y como se describe en Materiales y Métodos.

ii) El segundo ensayo emplea dos fluoróforos diferentes, AnexinaV y Ioduro de Propidio (**AnexinaV-IP**) y permite el análisis conjunto de las células viables, la muerte por apoptosis y la muerte por necrosis. Cabe mencionar que en este estudio el porcentaje de muerte representado en el eje de las ordenadas de las gráficas incluye el porcentaje de células apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas (para mayor detalle de este análisis ver Materiales y Métodos).

#### a) Efecto de AZD sobre la muerte celular en la línea celular resistente HGUE-C-1

El estudio de ciclo celular por citometría de flujo permite estimar el porcentaje de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular: fase subG<sub>1</sub>, fase G<sub>1</sub>, fase S y fase G<sub>2</sub>M. Sin embargo, en la Figura 25a y b solo hemos representado las fases G<sub>1</sub> y SubG<sub>1</sub> por ser las fases en las que se observan alteraciones funcionales y así los resultados resultan más claros. Al tratar la línea celular HGUE-C-1 con AZD 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  ó 10  $\mu\text{M}$  no se observa aumento en las fases G<sub>1</sub> ni SubG<sub>1</sub> del ciclo celular, lo que indica que AZD no es capaz de bloquear la proliferación ni inducir muerte celular a ninguna de estas tres concentraciones (Figuras 25a y b, respectivamente). Los estudios de apoptosis mediante AnexinaV-IP tampoco muestran inducción de muerte celular cuando AZD es utilizado a cualquiera de las tres concentraciones (Figura 25c). En este caso, la necrosis tampoco es inducida en respuesta al tratamiento con AZD 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  ó 10  $\mu\text{M}$  (Figura 25d), confirmándose la elevada resistencia de esta línea celular al tratamiento.

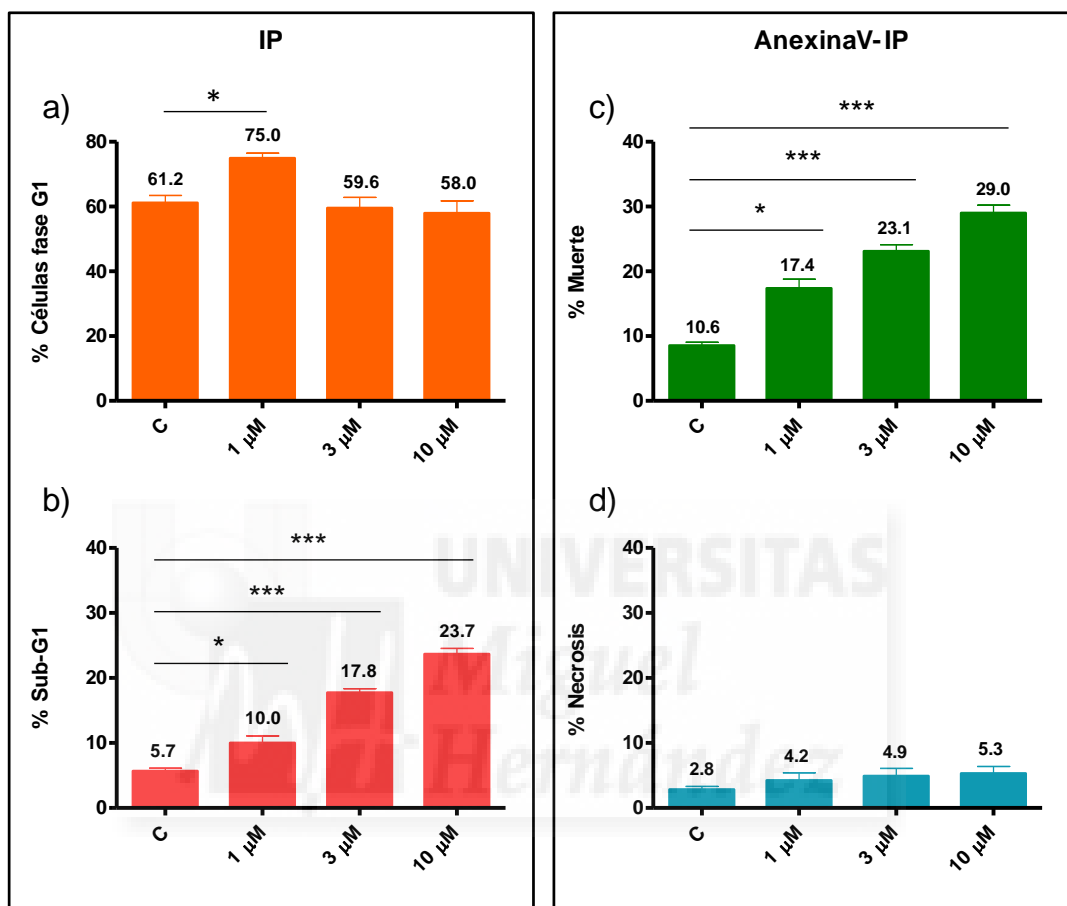


**Figura 25: Efecto de AZD sobre proliferación y muerte en línea celular HGUE-C-1. (a, b). Efecto de AZD sobre la distribución de las células en la fase SubG<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD 1, 3 y 10 μM durante 48 horas, tripsinizadas, marcadas con IP y analizadas por citometría de flujo. **(c, d) Efecto de AZD sobre la muerte celular mediante tinción con AnexinaV-IP.** Las células fueron tratadas como en (a, b), marcadas con AnexinaV-IP y analizadas por citometría de flujo para determinar la muerte celular. El valor de cada columna representa la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes n≥3.

### **b) Efecto de AZD sobre la muerte celular en la línea celular sensible SW480**

A continuación investigamos el efecto de concentraciones crecientes de AZD (1, 3, 10μM) sobre la muerte celular en la línea sensible SW480 realizando los mismos tipos de estudios de ciclo celular y apoptosis (Figura 26). Cuando SW480 fue tratada con AZD 1 μM, se produce un aumento del porcentaje de células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular del 13,8% respecto a la condición control (Figura 26a), lo que indica un bloqueo en esta fase del ciclo. Sin embargo, el aumento de la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular respecto a la condición control es mínimo (4,3%) (Figura 26b). Para corroborar este resultado, se realizaron estudios de apoptosis mediante tinción con AnexinaV-IP (Figuras 26c y d). De forma similar, AZD promueve un ligero aumento de muerte celular (6,8%) comparado con la condición control. En resumen, estos resultados

muestran claramente que AZD utilizado a una concentración 1  $\mu\text{M}$  actúa de forma predominantemente citoestática, conduciendo a un bloqueo de la proliferación celular, sin prácticamente ocasionar la muerte de las células. Este resultado corrobora los datos obtenidos del estudio de ciclo celular realizados previamente (Figura 15).



**Figura 26: Efecto de AZD sobre proliferación y muerte en línea celular SW480. (a, b) Efecto de AZD sobre la distribución de las células en las fases SubG<sub>1</sub> y G<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD 1, 3 y 10  $\mu\text{M}$  durante 48 horas, recolectadas por tripsinización, marcadas con IP y analizadas por citometría de flujo. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes  $n \geq 3$ . **(c, d) Efecto de AZD sobre la muerte celular utilizando AnexinaV-IP.** Las células fueron tratadas como en (a, b), marcadas con AnexinaV-IP para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos  $n \geq 3$ . Test *t* de Student: \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

A continuación quisimos explorar que ocurría cuando AZD era utilizado a concentraciones más elevadas de 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . En ambos casos, no se detecta una acumulación en la fase G<sub>1</sub> (Figura 26a) sino que se observa un aumento significativo en el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular del 12,1% (de  $5,7 \pm 0,4\%$  en la condición control a  $17,8 \pm 0,6\%$ ) y del 18,0% (de  $5,7 \pm 0,4\%$  a  $23,7 \pm 0,9\%$ ), respectivamente, lo que es indicativo de muerte celular



(Figura 26b). Para corroborar este resultado realizamos estudios de apoptosis mediante AnexinaV-IP (Figura 26c y d). De forma similar, en presencia de AZD 3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ , ocurre un aumento en el porcentaje de muerte celular del 12,5% (de  $10,6\pm 0,5\%$  en la condición control a  $23,1\pm 1,0\%$ ) y un aumento del 18,4 % (de  $10,6\pm 0,5\%$  a  $29\pm 1,2\%$ ) (Figura 26c).

Estos resultados, en conjunto, revelan que a concentraciones del compuesto bajas (1  $\mu\text{M}$ ), AZD actúa de una forma predominantemente citoestática. Sin embargo, a concentraciones mayores (3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) AZD ejerce un efecto citotóxico, provocando un aumento importante de muerte celular. El proceso de necrosis no parece ser un mecanismo importante en la acción de este compuesto a ninguna de las tres concentraciones utilizadas (Figura 26d).

## **2) Efecto de AZD sobre la autofagia**

El siguiente paso de este trabajo consistió en investigar si AZD era capaz de inducir autofagia en la línea celular resistente HGUE-C-1 y/o en la línea sensible SW480. Para el análisis de autofagia se han utilizado tres aproximaciones experimentales diferentes que han sido descritas detalladamente en el apartado de Materiales y Métodos:

- i) Estudio del nivel de proteínas autofágicas mediante Western blot
- ii) Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s.)
- iii) Estudio de la redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3

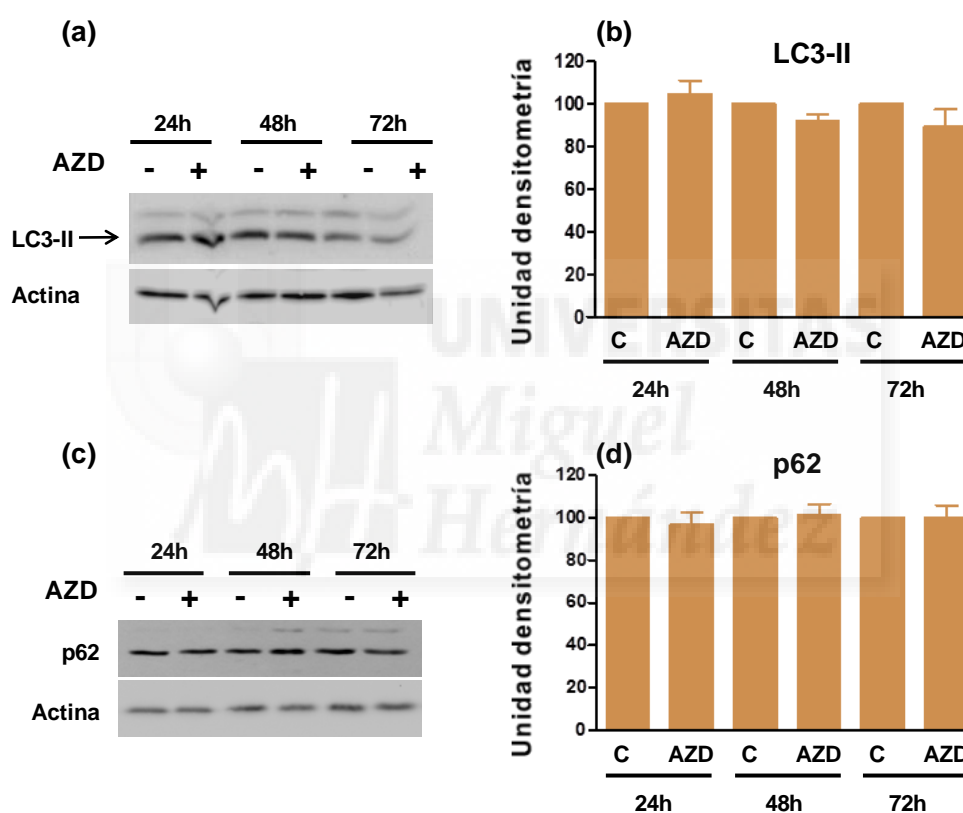
### **a) Efecto de AZD sobre la autofagia en la línea resistente HGUE-C-1**

#### **i) Estudio del nivel de proteínas autofágicas mediante Western blot**

Nuestro siguiente objetivo consistió en examinar si AZD era capaz de inducir autofagia en la línea resistente HGUE-C-1 y de ser así, si la autofagia podría desempeñar un papel en la resistencia a AZD. Con esta finalidad, en primer lugar investigamos el efecto de AZD 10  $\mu\text{M}$  sobre los marcadores de autofagia clásicos LC3-II y p62 (Figura 27). Brevemente, LC3-II es una proteína que es sintetizada cuando la autofagia es inducida y se inserta en la membrana de los autofagosomas, con lo que un aumento en los niveles de LC3-II por Western blot es un indicador

confiable de un aumento en la formación de autofagosomas. Como se observa en la Figura 27a y b, al incubar las células con AZD durante 24, 48 y 72 horas, los niveles de proteína LC3-II permanecen inalterados en el tiempo, lo que indica que AZD no induce la formación de autofagosomas en estas células.

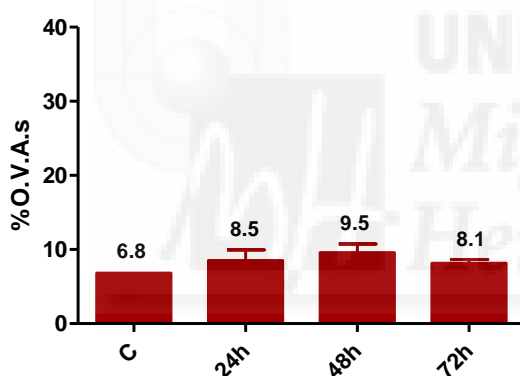
A continuación, investigamos el efecto de AZD sobre p62 un sustrato que participa en la autofagia y que es degradado en el autofagosoma durante este proceso. El tratamiento con AZD durante 24, 48 y 72 horas no provoca una disminución en los niveles de p62, indicando que AZD no es capaz de inducir su degradación en estas células (Figura 27c y d).



**Figura 27: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre niveles de LC3-II y p62 en línea celular HGUE-C-1.** Las células se incubaron en presencia (+) o ausencia (-) de AZD 10  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente, se obtuvieron los extractos de proteína que fueron analizados mediante Western blot, utilizando los anticuerpos anti-LC3 (a) y p62 (c) para determinar los niveles de proteína total. La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. Las figuras muestran un blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). **Densitometrías.** Las gráficas de barras representan la cantidad relativa de LC3-II (b) y p62 (d) en la línea celular HGUE-C-1. Los valores de densitometría obtenidos para la proteína total fueron normalizados con los valores obtenidos para  $\beta$ -actina, tal y como se describe detalladamente en Materiales y Métodos.

## ii) Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s.)

Durante la autofagia se forman estructuras de naturaleza ácida, que resultan de la fusión del autofagosoma con los lisosomas y son conocidas como “autofagolisosomas”. Con la finalidad de corroborar la ausencia de autofagia en la línea resistente HGUE-C-1, se investigó si al tratar las células con AZD se promovía la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s). Para ello, las células fueron incubadas con el indicador fluorescente Naranja de Acridina (N.A.), un fluoróforo que al incorporarse a vesículas ácidas se protona y es retenido en su interior. De esta manera, dicho fluoróforo permite detectar la presencia y estimar la cantidad de autofagolisosomas. Tal y como se observa en la Figura 28, al tratar las células con AZD, no se aprecia un aumento en el número de O.V.A.s, indicando que AZD no es capaz de inducir la formación de autofagolisosomas.

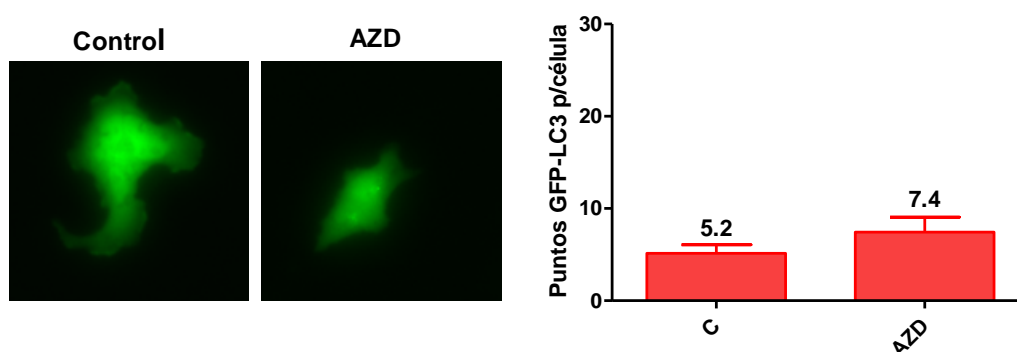


**Figura 28: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s) en la línea celular resistente HGUE-C-1.** Las células se incubaron en presencia de AZD 10  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Posteriormente, las células fueron incubadas con el fluoróforo Naranja de Acridina y analizadas por citometría de flujo para estimar el porcentaje de O.V.A.s. El valor de cada columna representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes  $n \geq 3$ .

## iii) Estudio de la redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3

Finalmente, para comprobar la ausencia de autofagia en la línea celular HGUE-C-1, investigamos si AZD inducía la redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3 (Figura 29). Para llevar a cabo este estudio, las células fueron transfectadas con el plásmido GFP-LC3 y posteriormente tratadas con AZD durante 48 horas. En ausencia de autofagia, la proteína de fusión GFP-LC3 se localiza en el citosol de la célula y por tanto, presenta una distribución difusa. Sin embargo, cuando se induce autofagia, LC3 se inserta en los autofagosomas que se forman y como resultado, GFP-LC3 adopta un aspecto puntuado característico. En nuestro estudio, al incubar las células con AZD, no se observa la aparición de ese puntillado

característico de LC3, lo que estaría indicando que AZD no promueve la formación de autofagosomas en estas células.



**Figura 29: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre la distribución de la proteína de fusión GFP-LC3 en la línea celular resistente HGUE-C-1.** Las células fueron transfectadas con el plásmido GFP-LC3 y posteriormente tratadas con AZD 10  $\mu$ M durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia con un objetivo 40X para analizar la distribución de GFP-LC3. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes  $n \geq 3$ . El gráfico corresponde a la cuantificación del número de puntos por célula (ver Materiales y Métodos para detalles).

En conjunto, los resultados presentados, indican claramente que AZD no es capaz de inducir la autofagia en la línea celular resistente HGUE-C-1, con lo que la autofagia no parece desempeñar un papel en la resistencia de estas células frente al tratamiento con AZD.

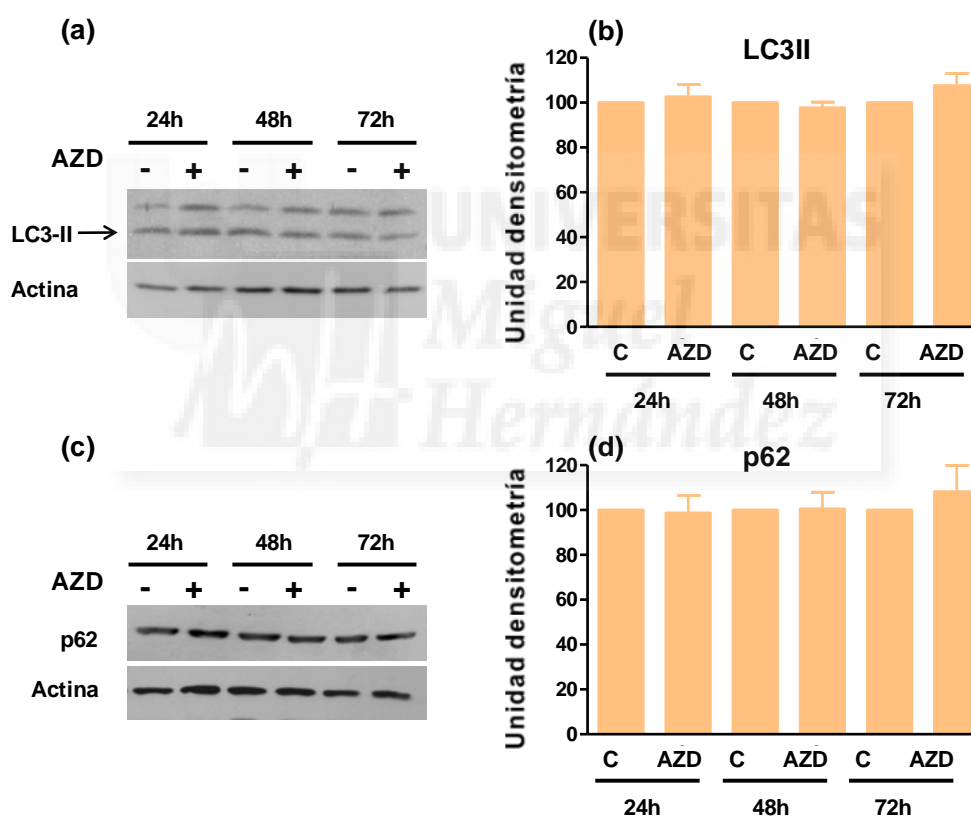
#### **b) Efecto de AZD sobre la autofagia en la línea celular sensible SW480**

Los estudios realizados anteriormente en la línea sensible SW480 muestran que AZD ejerce un efecto predominantemente citoestático o citotóxico dependiendo de la concentración utilizada (Figura 26). A una concentración de 1  $\mu$ M, el compuesto produce predominantemente un bloqueo de la proliferación celular, mientras que a concentraciones mayores (3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) induce muerte celular (Figura 26). En base a este resultado, nos resultó interesante investigar si AZD utilizado a alguna de estas concentraciones es capaz de inducir autofagia en la línea celular SW480.

## Efecto de AZD 1 $\mu$ M sobre la autofagia

### i) Estudio del nivel de proteínas autofágicas mediante Western blot

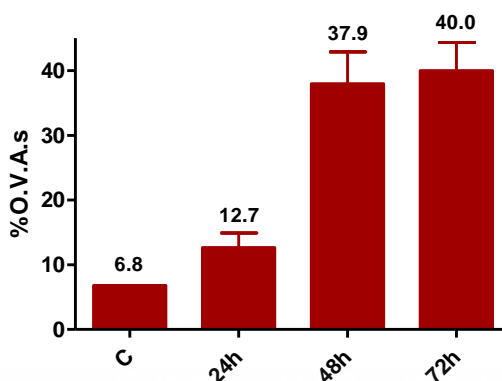
En primer lugar, investigamos si AZD utilizado a una concentración 1  $\mu$ M induce autofagia en la línea celular sensible SW480. Como se observa en la Figura 30, al tratar las células con AZD 1  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas, no es posible apreciar un aumento en los niveles de proteína total LC3-II, ni una disminución en los niveles de p62 (Figuras 30a, b y Figuras 30c, d, respectivamente). Este resultado, estaría indicando que AZD utilizado a esta concentración no induce la formación de autofagosomas, ni la degradación del sustrato p62 en éstas células.



**Figura 30: Efecto de AZD 1  $\mu$ M sobre niveles de LC3-II y p62 en la línea celular SW480.** Las células se incubaron con (+) o sin (-) AZD 1  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas y los extractos de proteína obtenidos se analizaron por Western blot utilizando el anticuerpo anti-LC3 (a) y p62 (c) para determinar los niveles de proteína total. Como control de carga se utilizó la proteína  $\beta$ -actina. Las figuras muestran blots representativos de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). **Densitometrías.** Los gráficos de barras representan la cantidad relativa de LC3-II (b) y p62 (d) en la línea celular SW480 en ausencia (C) y presencia (AZD) de AZD. Los valores de densitometría obtenidos para la proteína total fueron normalizados con los valores obtenidos para  $\beta$ -actina, tal y como se describe detalladamente en Materiales y Métodos.

## ii) Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s)

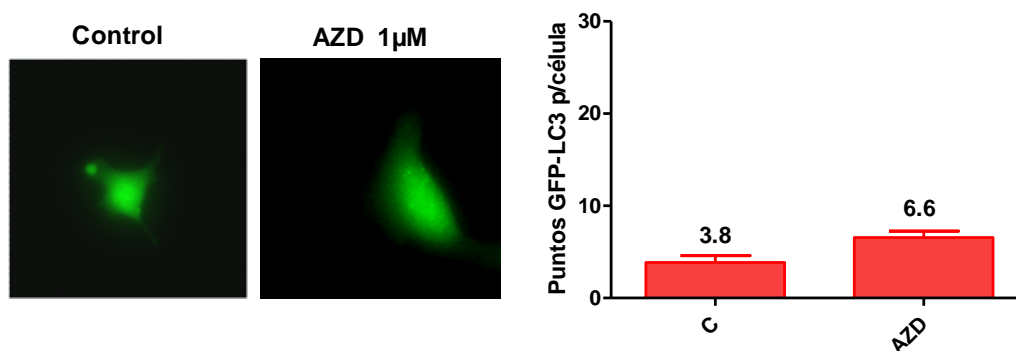
Para complementar el estudio anterior se investigó el efecto de AZD 1  $\mu$ M sobre la formación de O.V.A.s (Figura 31). Es interesante observar que al incubar la línea celular SW480 en presencia de AZD 1  $\mu$ M, ocurre un aumento en el porcentaje de O.V.A.s. Este aumento es muy marcado tras 48 horas de tratamiento con AZD y se mantiene tras 72 horas.



**Figura 31: Efecto de AZD 1  $\mu$ M sobre la formación de Orgánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s) en la línea sensible SW480.** Las células fueron incubadas en presencia de AZD 1  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas, incubadas con el fluoróforo Naranja de Acridina y analizadas por citometría de flujo para estimar el porcentaje O.V.A.s. Cada valor representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes  $n \geq 3$ .

## iii) Estudio de la redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3

Finalmente, realizamos el estudio de localización de GFP-LC3 y encontramos que en presencia de AZD 1  $\mu$ M no ocurre una redistribución de GFP-LC3 hacia los autofagosomas. En lugar de ello, GFP-LC3 se mantiene localizado de forma homogénea en el citosol de las células y no adopta el aspecto puntillado característico que indica la formación de autofagosomas (Figura 32).



**Figura 32: Efecto de AZD 1  $\mu$ M sobre la distribución de la proteína de fusión GFP-LC3 en la línea celular sensible SW480.** Las células se transfectaron con el plásmido GFP-LC3, se trataron con AZD 1  $\mu$ M durante 48 horas y se observaron mediante un microscopio de fluorescencia (objetivo 40X) para investigar la distribución de la proteína GFP-LC3. Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes  $n \geq 3$ . El gráfico representa el número de “puntos” de GFP-LC3 por célula.

En resumen, la utilización de AZD 1  $\mu$ M no induce un aumento en los niveles de LC3-II ni una disminución en los niveles del sustrato autofágico p62. Asimismo, tampoco se observa una alteración en la distribución de la proteína GFP-LC3 en las células, lo que en conjunto, demuestra que AZD utilizado a una concentración de 1  $\mu$ M no induce autofagia en estas células.

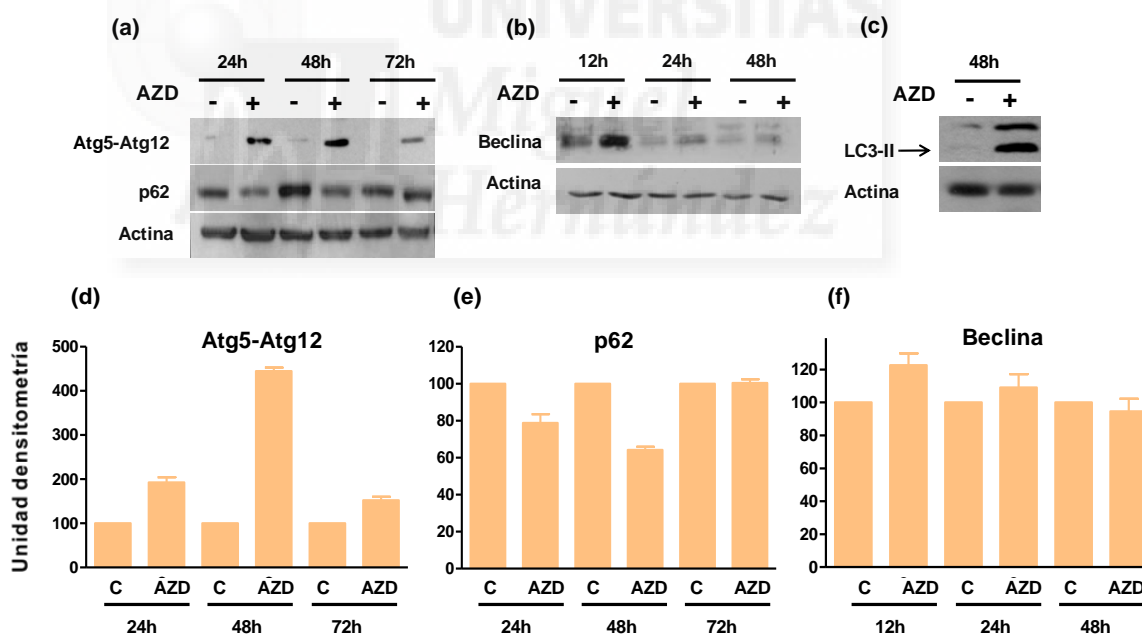
### **Efecto de AZD 10 $\mu$ M sobre la autofagia**

Los resultados anteriores muestran que el tratamiento de la línea celular sensible SW480 con una concentración 1  $\mu$ M conduce a un bloqueo en la proliferación celular (Figura 26). Sin embargo, los estudios de autofagia demuestran que AZD no induce autofagia cuando es utilizado a la misma concentración. Debido a que el tratamiento con una concentración de 10  $\mu$ M induce muerte celular, nos resultó interesante investigar si AZD utilizado a esta concentración era capaz de inducir autofagia. Para ello, se realizaron experimentos similares a los anteriores y se investigó además el efecto de AZD sobre los niveles de Beclina y del complejo Atg5-Atg12.

#### **i) Estudio del nivel de proteínas autofágicas mediante Western blot**

La Figura 33 muestra el efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre los niveles de complejo Atg5-Atg12, p62 y LC3-II y Beclina. El complejo Atg5-Atg12 es un conjugado proteico que participa en las fases iniciales de la autofagia, más específicamente en la formación del autofagosoma. Como se observa en la Figura 33, en presencia de AZD 10  $\mu$ M se produce un aumento muy marcado en los niveles de Atg5-Atg12 (Figura 33a y d). El aumento en los niveles de esta proteína se detecta

tras 24 horas de tratamiento, se acentúa tras 48 horas y comienza a remitir tras 72 horas de incubación con AZD, lo que indica que el efecto máximo se obtiene a las 48 horas de tratamiento. De forma interesante, el estudio de p62 pone de manifiesto una clara disminución de esta proteína en el tiempo (Figura 33a y e). La disminución de p62 ya es evidente tras 24 horas y el efecto de disminución es máximo a las 48 horas de tratamiento. Sin embargo, tras 72 horas el efecto de disminución en los niveles de p62 desaparece. A continuación exploramos el efecto de AZD sobre Beclina, una proteína que forma un complejo con PI3KIII y otras proteínas y participa en la formación del autofagosoma. Debido a que esta proteína interviene en las etapas iniciales de la autofagia, analizamos el efecto de AZD sobre los niveles de Beclina a partir de las 12 horas de tratamiento y hasta las 48 horas (Figura 33b y f). Como se observa, el aumento de Beclina es marcado tras 12 horas de tratamiento y comienza a ser menos evidente a las 24 horas, desapareciendo este efecto tras 48 horas de incubación con AZD. Finalmente, el estudio de los niveles de LC3-II muestra un aumento muy marcado de LC3-II en presencia de AZD tras 48 horas de tratamiento, indicando una fuerte inducción en la formación de autofagosomas en estas células (Figura 33c).

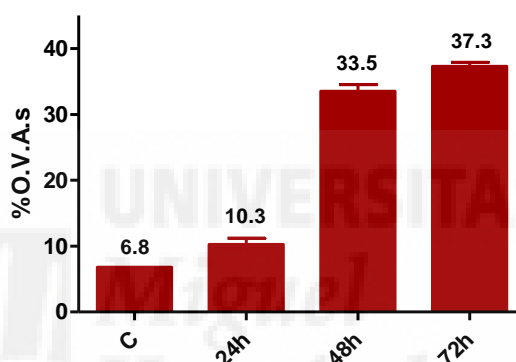


**Figura 33: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre niveles de Atg5-Atg12, p62, Beclina y LC3-II en la línea celular SW480. (a), (b), (c) Western blot.** Las células se incubaron con (+) o sin (-) AZD 10  $\mu$ M durante el tiempo correspondiente y los extractos de proteína se estudiaron por Western para determinar los niveles de Atg5-Atg12 (a), p62 (a), Beclina (b) y LC3-II (c). La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. Las figuras muestran Western blots representativos de al menos tres experimentos,  $n \geq 3$ . **Densitometrías.** Los gráficos de barras representan los niveles relativos de Atg5-Atg12 (d) p62 (e) y Beclina (f) en la línea celular SW480 en ausencia y presencia AZD. Los valores obtenidos para la proteína total fueron normalizados con los valores obtenidos para  $\beta$ -actina, tal y como se describe detalladamente en Materiales y Métodos.



## ii) Estudio de la formación de Orgánulos Vesiculares Acidos (O.V.A.s)

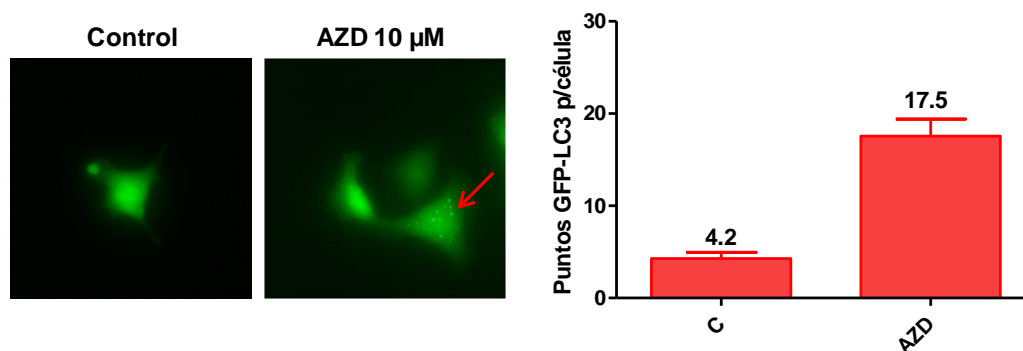
A continuación, realizamos el estudio de O.V.A.s para determinar si existía una inducción en la formación de orgánulos ácidos. Como se muestra en la Figura 34, cuando la línea celular sensible SW480 es tratada con AZD 10  $\mu$ M, se induce un aumento muy marcado en la formación de O.V.A.s. Este aumento comienza a las 24 horas de tratamiento ( $10,3\pm 0,9\%$ ), haciéndose muy evidente tras 48 horas ( $33,5\pm 1,0\%$ ), y se mantiene e incluso aumenta tras 72 horas de tratamiento ( $37,3\pm 0,6\%$ ). Es interesante notar que el efecto máximo en este caso ocurre tras 72 horas de tratamiento, lo que puede deberse a que la formación de vesículas ácidas es un evento tardío en el proceso de autofagia.



**Figura 34: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre la formación de Orgánulos Vesiculares Acidos (O.V.A.s) en línea celular SW480.** Las células se incubaron en presencia de AZD 10  $\mu$ M durante 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo correspondiente, las células fueron recolectadas por tripsinización, incubadas con el fluoróforo Naranja de Acridina y analizadas por citometría de flujo para estimar el porcentaje de O.V.A.s. El valor de cada columna representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes  $n\geq 3$ .

## iii) Estudio de la redistribución de GFP-LC3

El siguiente paso fue investigar si existía una alteración en el patrón de distribución de GFP-LC3 en presencia de AZD 10  $\mu$ M. Como se observa en la Figura 35, al tratar las células con AZD 10  $\mu$ M, se produce una clara redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3, que pasa de tener una distribución citosólica difusa en condiciones control a una distribución puntuada en presencia de AZD (flecha roja). Este puntillado característico estaría indicando la presencia de LC3-II en los autofagosomas, estructuras clave en el proceso de autofagia.

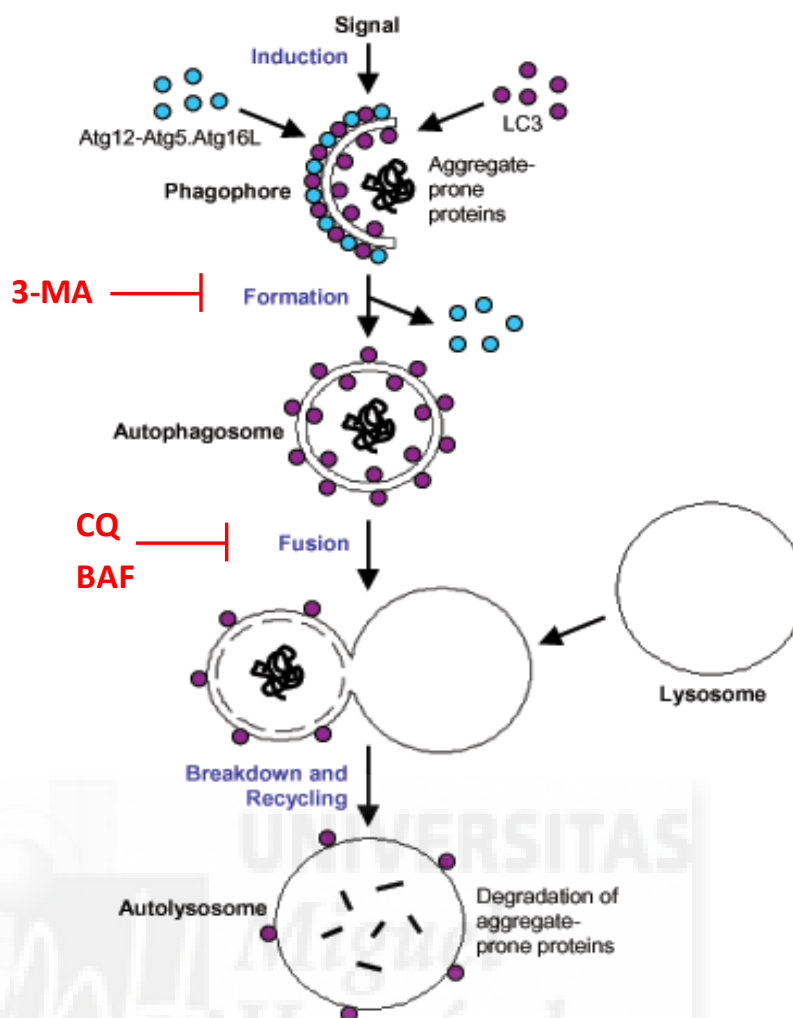


**Figura 35: Efecto de AZD 10  $\mu$ M sobre la distribución de la proteína de fusión GFP-LC3 en la línea celular SW480.** Las células se transfectaron con el plásmido GFP-LC3 y posteriormente se trataron con AZD 10  $\mu$ M durante 48 horas. Transcurrido este tiempo, las células fueron observadas mediante microscopía de fluorescencia para analizar la distribución de GFP-LC3 en las células. Notar la presencia de “puntos” en presencia de AZD que indica la formación de autofagosomas (flecha roja). Las imágenes son representativas de al menos tres experimentos independientes,  $n \geq 3$ . En el gráfico se representa la cantidad de “puntos” de GFP-LC3 por célula, tal y como se describe en Materiales y Métodos.

En resumen, los resultados demuestran claramente que AZD utilizado a una concentración de 10  $\mu$ M induce un aumento en los niveles de Atg5-Atg12, LC3-II y Beclina y una disminución en los niveles del sustrato autofágico p62. Asimismo, ocurre también un aumento en el porcentaje de O.V.A.s así como una clara redistribución de la proteína de fusión GFP-LC3 que adquiere un aspecto puntuado característico, indicando la presencia de autofagosomas.

### 3) Efecto de la inhibición de autofagia sobre la muerte inducida por AZD en SW480

Los resultados anteriores muestran que AZD 10  $\mu$ M induce muerte celular acompañada de autofagia en la línea celular sensible SW480. Con la finalidad de comprender el papel de la autofagia en la muerte inducida por AZD nos preguntamos si la inhibición farmacológica mediante inhibidores de autofagia a concentraciones que no afecten la viabilidad, tendría efecto sobre la muerte celular inducida por AZD. Para llevar a cabo este estudio hemos empleado tres inhibidores clásicos de autofagia: Cloroquina, Bafilomicina A1 y 3-Metiladenina (Figura 36).



**Figura 36: Inhibidores clásicos de autofagia.** En la Figura se muestran los tres inhibidores de autofagia utilizados en este estudio. La 3-Metiladenina (3-MA) inhibe la etapa inicial de la autofagia mientras que la cloroquina (CQ) y la Bafilomicina A1 (BAF) inhiben las fases finales, es decir, la fusión del autophagosome con el lisosoma. Figura modificada de <http://www.mit.edu/~sarkar/Research.html>.

### a) Inhibición de autofagia por Bafilomicina A1, Cloroquina y 3-Metiladenina

En apartados anteriores hemos visto cómo la inducción de la formación de autophagomas se traduce en un aumento en los niveles de la proteína LC3-II por Western blot. Sin embargo, se debe tener en cuenta que el autophagosome es una estructura intermedia que se está continuamente formando y degradando dentro de una vía dinámica. Como resultado, el número de autophagomas que se observan en un determinado momento es una función del balance entre su velocidad de formación y su velocidad de conversión en autophagolisomas (fusión de autophagosome con lisosoma). Por lo tanto, la acumulación de autophagomas, que se traduce en un aumento de LC3-II, puede representar tanto una **inducción** de la autofagia (como vimos en

apartados anteriores) o alternativamente, una **inhibición de la autofagia en sus fases finales**, es decir, una vez formado el autofagosoma.

Bafilomicina A1 (BAF) y Cloroquina (CQ) son compuestos que inhiben las fases finales de la autofagia. BAF inhibe de forma específica la enzima ATPasa de tipo V, una clase de  $H^+$ ATPasa existente en los lisosomas. Dicha inhibición provoca un aumento del pH lisosomal (Bowman et al., 1988; Moriyama and Nelson, 1989; Yoshimori et al., 1991). Como resultado, se bloquea la fusión del lisosoma con el autofagosoma ya que la acidez en el interior del lisosoma es un requisito indispensable para su fusión con los autofagosomas (Yamamoto et al., 1998). Como consecuencia del bloqueo en la fusión lisosoma/autofagosoma, los autofagosomas se acumulan en el citosol y los niveles de proteína LC3-II aumentan, debido a que LC3-II se localiza en la membrana del autofagosoma y no es capaz de ser degradado por las enzimas lisosomales.

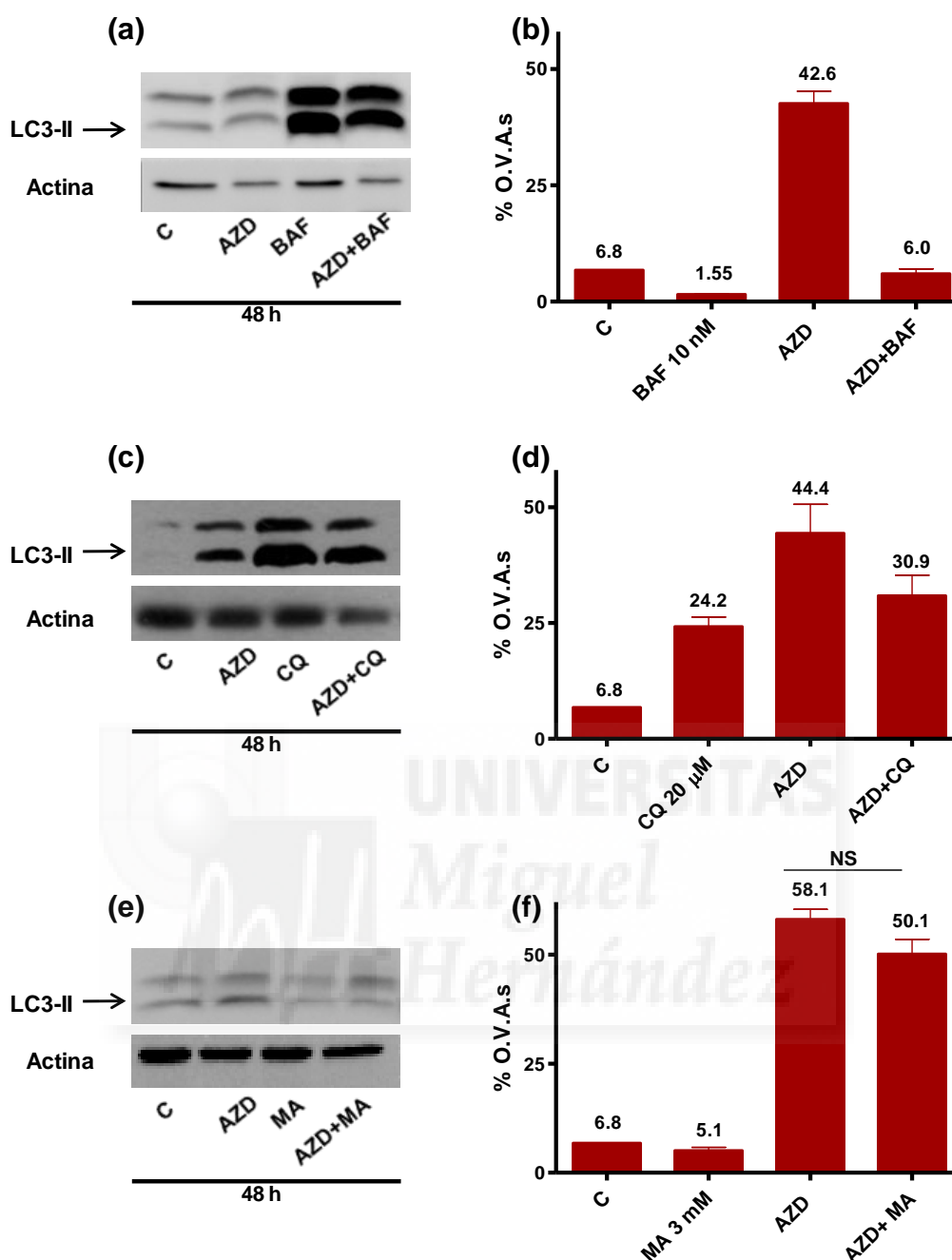
CQ es una droga muy utilizada y efectiva para el tratamiento de la malaria. Debido a sus propiedades lisosomotrópicas, difunde rápida y libremente a través de la membrana celular y orgánulos. Al ingresar a orgánulos de naturaleza ácida como los lisosomas, la CQ es protonada y queda “atrapada” en su interior. Como resultado, el pH dentro de los lisosomas se alcaliniza lo que conduce a la inhibición de las enzimas lisosomales (actúan a pH ácidos) y al bloqueo de la fusión lisosoma/autofagosoma (Solomon and Lee, 2009; Kimura et al., 2013). En resumen, la inhibición de la autofagia por BAF y CQ, se traducen en un aumento en los niveles de la proteína autofágica LC3-II.

A diferencia de BAF y CQ, 3-Metiladenina (3-MA) inhibe la autofagia en sus etapas iniciales. Específicamente, 3-MA inhibe a la enzima PI3KIII, que participa al inicio del proceso autofágico, en la formación del autofagosoma. De esta forma, 3-MA evita la formación de autofagosomas, lo que se traduce en una disminución en los niveles de LC3-II por Western blot y no en un aumento, como en el caso de BAF y CQ.

Hechas estas consideraciones, el primer paso en los estudios de inhibición de autofagia fue comprobar que los tres compuestos utilizados, BAF, CQ y 3-MA eran capaces de inhibir la autofagia en la línea celular SW480 (Figura 37). Como se observa en los Western blots control (Figura 37a y c), la incubación de las células con BAF o CQ conducen a un aumento muy marcado de la proteína autofágica LC3-II tanto en ausencia como en presencia de AZD,

indicando que ambos compuestos inducen la acumulación de autofagosomas y por tanto inhiben la autofagia en sus fases finales. Asimismo, los estudios control de O.V.A.s indican que el tratamiento con AZD+BAF o AZD+CQ disminuye el porcentaje de O.V.A.s respecto a las células tratadas con AZD exclusivamente, lo que indica que tanto BAF como CQ inhiben la formación de vesículas ácidas en estas células (Figuras 37b y d). Por otra parte, la inhibición de la autofagia por 3-MA queda demostrada por una disminución en los niveles de LC3-II, tanto en ausencia como en presencia de AZD. Sin embargo, la disminución en los niveles de proteína no es muy marcada (Figura 37e). Por su parte, el estudio de formación de orgánulos ácidos indica que la disminución en la formación de O.V.A.s (AZD vs AZD+3-MA) no es significativa y es mucho menor en comparación con el uso de BAF o CQ (Figura 37f).





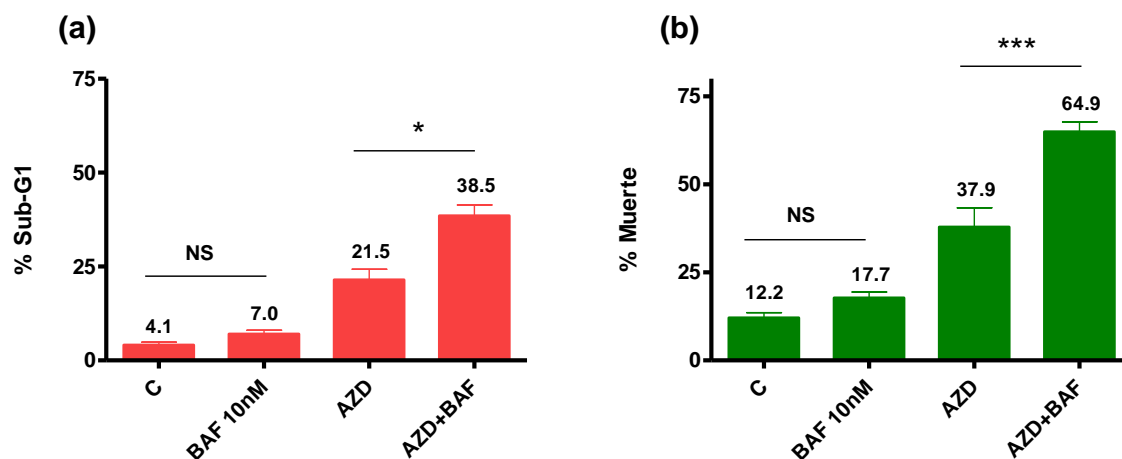
**Figura 37: Inhibición de autofagia por BAF, CQ y 3-MA en la línea celular sensible SW480 (a, c, e) Western blots.** Las células fueron tratadas con AZD (10  $\mu$ M), BAF (10 nM), CQ (20 $\mu$ M), 3-MA (3 mM) o una combinación de AZD+BAF, AZD+CQ, AZD+3-MA y posteriormente se obtuvieron los extractos proteicos que fueron analizados por Western blot. La proteína  $\beta$ -actina fue utilizada como control de carga. En el caso de los tratamientos AZD+BAF y AZD+CQ, las células fueron incubadas con AZD y a las 24 horas fueron incubadas con BAF o CQ durante 24 horas más. En el caso de los experimentos de AZD+3-MA, las células fueron incubadas simultáneamente con AZD+3-MA durante 48 horas. **(b, d, f) Estudio de la formación de O.V.A.s.** Las células fueron tratadas como en los experimentos de Western blot (a, c, e) y posteriormente incubadas con el fluoróforo Naranja de Acridina y analizadas por citometría de flujo para estimar el porcentaje de Orgánulos Vesiculares Acidos (%O.V.A.s). El valor de cada columna representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos,  $n \geq 3$ . Test  $t$  de Student: NS: no significativo.

### c) Efecto de BAF sobre la muerte celular inducida por AZD

Tras corroborar que BAF inhibe la autofagia en estas células, investigamos si en presencia de dicho inhibidor se modifica el patrón de respuesta a AZD (Figura 38). Para ello, realizamos análisis de ciclo celular y estudios de apoptosis mediante tinción con AnexinaV-IP (Figura 38a y b, respectivamente). En los estudios de ciclo celular se representa exclusivamente la fase SubG<sub>1</sub> por ser la fase que se vio alterada por los tratamientos.

La gráfica correspondiente a los estudios de ciclo celular pone de manifiesto que cuando las células son incubadas con AZD 10  $\mu$ M durante 48 horas, se produce una acumulación de las mismas en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular de un  $21,5\pm 2,8\%$ , indicando la acción citotóxica de AZD sobre la línea celular sensible SW480, como hemos observado en experimentos anteriores (Figura 26). Sin embargo, el tratamiento conjunto de AZD+BAF produce una mayor acumulación de las células en esta fase del ciclo ( $38,5\pm 2,9\%$ ). Es importante destacar que el inhibidor BAF utilizado de manera individual no compromete de manera significativa la viabilidad de las células, ya que el aumento en la fase SubG<sub>1</sub> representa menos del 3% respecto a la condición control.

Asimismo, los ensayos de apoptosis mediante AnexinaV-IP evidencian que AZD es capaz de inducir muerte celular en un  $37,9\pm 5,5\%$ , mostrando nuevamente la elevada toxicidad de este compuesto en estas células. Por su parte, en presencia simultánea de AZD+BAF, se produce un aumento mayor de muerte celular ( $64,9\pm 2,8\%$ ) respecto a las células tratadas con AZD exclusivamente. Estos resultados en conjunto indican que en presencia del inhibidor autofágico BAF, la línea celular SW480 se sensibiliza al tratamiento con AZD.

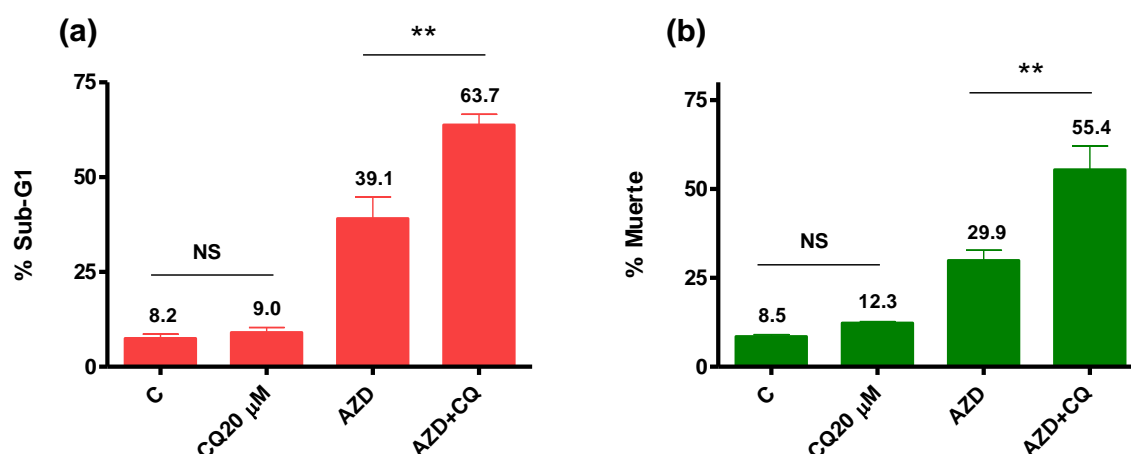


**Figura 38: Efecto de BAF sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480. (a) Efecto sobre la distribución de las células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD (10  $\mu$ M), BAF (10 nM) o una combinación de ambos (AZD+BAF) de la misma manera como se detalla en la Figura 37. Tras el tratamiento, las células fueron recolectadas por tripsinización, marcadas con IP y analizadas por citometría de flujo. **(b) Efecto sobre la muerte celular mediante tinción con AnexinaV-IP.** Las células fueron tratadas como en (a) y marcadas con AnexinaV-IP para posteriormente ser analizadas por citometría de flujo. El valor de cada columna representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes,  $n \geq 3$ . Test *t* de Student: NS: no significativo, \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### d) Efecto de CQ sobre la muerte celular inducida por AZD

A continuación exploramos si la inhibición de la autofagia mediante CQ en la línea celular SW480 potencia la muerte celular inducida por AZD, tal y como ocurre con el inhibidor BAF. Los estudios de ciclo celular muestran que al tratar las células con AZD, un  $39,1 \pm 5,7\%$  de las células se acumulan en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo, debido al efecto citotóxico de este compuesto (Figura 39a). Sin embargo, el tratamiento con AZD+CQ, provoca un aumento de la fase SubG<sub>1</sub> del  $24,6\%$  (de  $39,1 \pm 5,7\%$  a  $63,7 \pm 2,8\%$ ). De forma semejante, los ensayos con AnexinaV-IP (Figura 39b) indican que el tratamiento de las células con AZD+CQ produce un aumento en el porcentaje de muerte celular del  $25,5\%$ , respecto a las células tratadas con AZD exclusivamente (de  $29,9 \pm 2,9\%$  a  $55,4 \pm 6,7\%$ ). Dichos valores son semejantes a los obtenidos en el estudio realizado con el inhibidor BAF, en el que la muerte celular aumenta un  $27,0\%$  en presencia de AZD+BAF (Figura 38). En conjunto, estos datos revelan que el tratamiento con AZD y CQ sensibiliza a las células al tratamiento con AZD. Es importante destacar que CQ utilizada a la concentración de trabajo (20  $\mu$ M) no altera de forma significativa la viabilidad de las células. En este caso, la incubación con CQ produce un mínimo aumento de la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo (Figura 39a) o de muerte celular (Figura 39b).

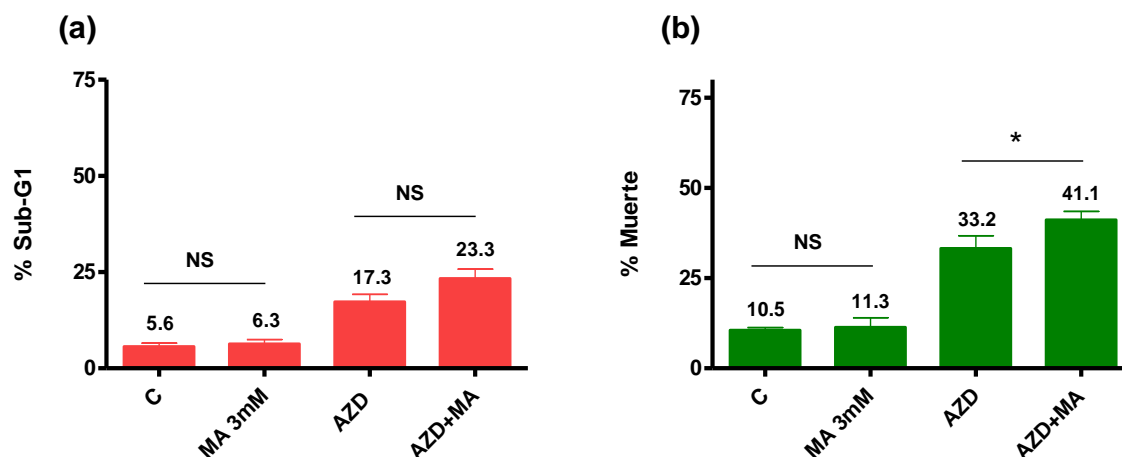




**Figura 39: Efecto de CQ sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480. (a) Efecto sobre la distribución de las células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD (10 μM), CQ (20μM) o una combinación de ambos (AZD+CQ) de la misma manera como se detalla en la Figura 37. Tras el tratamiento, las células se tripsinizaron, marcaron con IP y analizaron por citometría de flujo. **(b) Efecto sobre la muerte celular mediante tinción con AnexinaV-IP.** Las células se trataron como en (a), tiñeron con AnexinaV-IP y analizaron utilizando un citómetro de flujo. El valor de cada columna representa la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes, n≥3. Test *t* de Student: NS: no significativo, \*\* p<0.01.

#### e) Efecto de 3-MA sobre la muerte celular inducida por AZD

Finalmente, exploramos si la combinación de 3-MA con AZD potencia la muerte celular inducida por AZD. En este caso, los estudios de ciclo celular (Figura 40a) no muestran una diferencia significativa entre la muerte celular causada por AZD exclusivamente (17,3±1,9%) y la muerte celular en presencia de AZD+3-MA (23,3±2,4%). Asimismo, los ensayos de apoptosis con AnexinaV-IP muestran que en presencia de AZD+3-MA, ocurre un aumento poco significativo en el porcentaje de muerte celular (41,1±2,4%) respecto al uso de AZD de forma individual (33,2±3,6%).



**Figura 40: Efecto de 3-MA sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480. (a) Efecto sobre la distribución de las células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas con AZD (10 μM), 3-MA (3mM) o una combinación de ambos (AZD+MA) durante 48 horas y marcadas con IP para su posterior análisis por citometría de flujo. **(b) Efecto sobre la muerte celular mediante tinción con AnexinaV-IP.** Las células se trataron como en (a), tiñeron con AnexinaV-IP y analizaron utilizando un citómetro de flujo. El valor de cada columna representa la media ± SEM de al menos tres experimentos independientes, n≥3. Test *t* de Student: NS: no significativo, \* p<0.05.

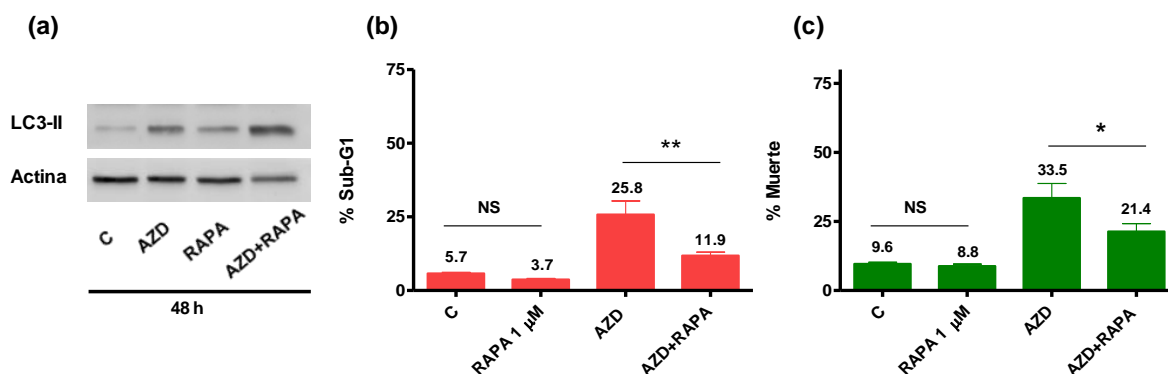
#### 4) Efecto de la inducción de autofagia sobre la muerte inducida por AZD

El paso final de este estudio fue utilizar las mismas aproximaciones experimentales para contestar la pregunta opuesta, es decir, investigar qué sucede con la muerte celular si se estimula la autofagia. Con esta finalidad, se empleó un inductor clásico de autofagia, la rapamicina (RAPA) a una concentración que no comprometiera la viabilidad de las células. RAPA es un inhibidor de mTOR. Además de sus funciones ya conocidas, como su papel en la proliferación, síntesis de proteínas, etc., mTOR es un inhibidor de la autofagia. Cuando mTOR es inhibida, se activan proteínas clave que disparan el proceso de autofagia.

Los experimentos control de Western blot muestran que tanto AZD como RAPA conducen a un aumento en los niveles de LC3-II y en presencia de AZD+RAPA, los niveles de LC3-II son aún mayores, lo que indica que RAPA induce la autofagia tanto en ausencia como en presencia de AZD (Figura 41a).

De forma interesante, los estudios de ciclo celular indican que la combinación de AZD+RAPA produce una disminución significativa en el porcentaje de células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular, de un 25,8±4,6% a un 11,9±1,2% respecto a las células tratadas con AZD exclusivamente (Figura 41b). Asimismo, los ensayos de apoptosis empleando AnexinaV-IP

también revelan una disminución en el porcentaje de muerte celular de las células incubadas con AZD+RAPA respecto a las células incubadas con AZD exclusivamente, aunque esta disminución no es tan significativa como en el caso del ciclo celular (Figura 41c). En resumen, los resultados de combinación de AZD+RAPA indican que una inducción en la autofagia protege a las células de la muerte celular inducida por AZD.



**Figura 41: Efecto de RAPA sobre la muerte celular inducida por AZD en la línea celular sensible SW480. (a) Inducción de la autofagia por RAPA.** Las células se incubaron con AZD 10μM y/o RAPA 1 μM durante 48 h y los extractos de proteína fueron analizados por Western blot usando la proteína β-actina como control de carga. La figura muestra un blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). **(b) Efecto sobre la distribución de las células en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular.** Las células fueron tratadas como en (a), tripsinizadas, marcadas con IP y analizadas por citometría de flujo. **(c) Efecto sobre la muerte celular mediante tinción con AnexinaV-IP.** Las células fueron tratadas como en (a), marcadas con AnexinaV-IP y analizadas por citometría de flujo. El valor de cada columna representa la media  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes,  $n \geq 3$ . Test *t* de Student: NS: no significativo\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ .

# DISCUSIÓN I



La incidencia y mortalidad por CCR ha disminuido en los últimos años gracias a los esfuerzos en mejorar la detección precoz de la enfermedad, a la eliminación de pólipos precancerosos y al avance en los tratamientos. A pesar de ello, la supervivencia a cinco años es menor del 10% en los pacientes con metástasis irresecable (Silvestri et al., 2013). El mayor problema en el tratamiento de estos pacientes consiste en la resistencia de los tumores a los fármacos empleados para su tratamiento. El estudio de los mecanismos mediante los cuales un tumor evade el tratamiento quimioterapéutico ha ayudado a comprender por qué fallan determinadas terapias.

La vía RAF/MEK/ERK ha sido foco de atención en la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos para el tratamiento de CCR debido a la elevada frecuencia de las mutaciones en los genes *KRAS* (30-40%) y *BRAF* (5-10%), identificadas en tumores de colon (Lievre et al., 2010; Arrington et al., 2012) y del papel crítico de esta ruta en la proliferación celular y supervivencia (Peyssonnaud and Eychene, 2001). Además, ERK1/2 se encuentra frecuentemente activada en líneas celulares de CCR y tumores primarios humanos derivados del colon (Hoshino et al., 1999).

La proteína quinasa MEK1/2 ocupa una posición central en la vía RAF/MEK/ERK. Esta proteína se caracteriza por la presencia de un sitio para la unión de inhibidores adyacente al sitio de unión de ATP, que permite la unión altamente específica de pequeñas moléculas inhibitoras. Se ha propuesto que la unión del inhibidor bloquea a MEK1/2 en una conformación inactiva que permite la unión de ATP y de su sustrato ERK1/2, pero altera la interacción molecular requerida para la catálisis y el acceso al bucle de activación de ERK1/2 (Ohren et al., 2004). Hasta la fecha, el único sustrato identificado de MEK1/2 ha sido ERK1/2 y a su vez, MEK1/2 es el sustrato exclusivo de RAF (Matallanas et al., 2011). Por tanto, MEK1/2 tiene un gran potencial para ser utilizada como diana en tratamientos quimioterapéuticos.

El compuesto AZD (Selumetinib, ARRY-142886) es un inhibidor oral altamente selectivo de MEK1/2, que está siendo evaluado actualmente en ensayos clínicos (Catalanotti et al., 2013; Kirkwood et al., 2012). Dicho compuesto inhibe MEK1 con una  $IC_{50}$  de 14 nM (Yeh et al., 2007), y ha demostrado ejercer efectos antiproliferativos y proapoptóticos en líneas celulares tumorales en cultivo y en xenotrasplantes (Davies et al., 2007). La unión del inhibidor AZD a MEK1/2 impide la fosforilación de ERK1/2 y como consecuencia bloquea la vía RAF/MEK/ERK.

En los últimos años se han realizado grandes esfuerzos en intentar identificar biomarcadores predictivos de respuesta a inhibidores de MEK1/2, incluyendo AZD. A pesar de estudios intensos, la base molecular y genética para la resistencia a AZD no está bien definida. Uno de los objetivos principales de este trabajo de tesis ha consistido en la búsqueda de marcadores de resistencia al tratamiento con AZD en líneas celulares de adenocarcinoma de colon.

El punto de partida consistió en investigar el efecto dosis-respuesta de AZD sobre la proliferación celular en un panel de ocho líneas celulares humanas de carcinoma de colon. Mediante estudios de proliferación por MTT y análisis de ciclo celular hemos identificado un grupo de líneas celulares sensibles y otro grupo altamente resistente a AZD. Los estudios de proliferación celular mediante ensayos de MTT muestran que el 50% de estas líneas celulares son altamente susceptibles al tratamiento con AZD, mientras que el otro 50% presentan una elevada resistencia (Figura 14). Basados en estos resultados, hemos clasificado las diferentes líneas celulares en sensibles y resistentes, de acuerdo a su valor de  $IC_{50}$ . Así, las líneas celulares cuyo  $IC_{50}$  era  $\leq 1\mu M$  se consideraron sensibles y las líneas celulares con  $IC_{50} \geq 1\mu M$  se clasificaron como resistentes (Tabla 4). Los estudios de formación de colonias en agar blando en las líneas celulares seleccionadas para este estudio confirmaron los datos obtenidos por MTT (Tabla 5). Para comprender mejor el efecto antiproliferativo observado en las líneas celulares sensibles, realizamos estudios de ciclo celular mediante citometría de flujo (Tablas 6 y 7 y Figura 15). Estos ensayos muestran claramente que el efecto antiproliferativo es debido principalmente a una acumulación de las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular (Tabla 6). Este efecto acumulativo indicaría un bloqueo en la proliferación en éstas células, indicando que AZD estaría actuando de forma citoestática a la concentración utilizada (1  $\mu M$ ). Este comportamiento diferencial de respuesta a AZD se debe a que cada línea celular es distinta a nivel molecular y proviene de pacientes con un contexto genético y ambiental únicos. La identificación de un grupo de líneas celulares sensibles y otro grupo altamente resistente fue lo que nos motivó a la búsqueda de posibles biomarcadores moleculares de respuesta a AZD.

Las mutaciones en el gen *BRAF* han sido foco de estudio en diversos trabajos como un posible marcador de respuesta a inhibidores de MEK1/2 como AZD (Leboeuf et al., 2008). Estudios previos realizados en tumores de melanoma muestran que las líneas celulares con mutaciones en *BRAF*, específicamente la mutación *V600E*, son más sensibles a inhibidores de

MEK1/2, comparado con células de tipo salvaje o células con mutaciones en *KRAS* (Solit et al., 2006). Se postula que los tumores con *BRAF* mutado dependerían principalmente de la ruta de señalización RAF/MEK/ERK para proliferar y crecer y por tanto, serían más sensibles al tratamiento con inhibidores de MEK1/2 que otro tipo de tumores. Sin embargo, recientemente, este mismo grupo de investigación ha llevado a cabo estudios clínicos de fase II en pacientes con melanoma que muestran que las mutaciones en *BRAF* por sí solas no servirían para predecir la respuesta a AZD (Catalanotti et al., 2013). En este estudio los pacientes, todos ellos con tumores con mutaciones en *BRAF*, fueron divididos en dos grupos: un grupo presentaba tumores con altos niveles de p-AKT y el otro grupo bajos niveles de p-AKT. Observaron que los tumores de aquellos pacientes con *BRAF* mutado y bajos niveles de p-AKT disminuyeron su tamaño tras el tratamiento con AZD. Por su parte, los tumores de pacientes con *BRAF* mutado y elevada actividad de AKT se mostraron refractarios al tratamiento. Estos resultados indican que las mutaciones en *BRAF* exclusivamente no serían suficientes para predecir la respuesta a AZD y que habría otros factores genéticos involucrados (Catalanotti et al., 2013). En nuestro trabajo, observamos que si bien la línea celular más sensible a AZD (HT-29) presenta la mutación V600E, las demás líneas celulares sensibles al tratamiento no poseen dicha mutación (Tabla 8). Estos resultados apoyan los datos presentados por Balmanno y colaboradores, que muestran que no existe una estrecha vinculación entre el estado mutacional de *BRAF* y la sensibilidad a AZD en líneas celulares de colon (Balmanno et al., 2009).

La mutación en el gen *KRAS* ha ganado terreno en los últimos años como posible marcador de respuesta a inhibidores de MEK1/2. Sin embargo, en todos los trabajos publicados hasta la fecha se ha demostrado que la mutación en el gen *KRAS* “per se” no sería suficiente para predecir la respuesta a inhibidores de MEK1/2 en cáncer de colon y otro tipo de tumores (Little et al., 2011; Yeh et al., 2009; Wee et al., 2009; Meng et al., 2009). En nuestro estudio observamos gran variación de respuesta a AZD entre las líneas celulares que presentan mutaciones en *KRAS*, lo que demostraría una vez más que las mutaciones en *KRAS* exclusivamente no predecirían la sensibilidad a AZD (Tabla 8). La complejidad de esta asociación podría deberse a que existen varias dianas efectoras de la proteína RAS, además de la vía de señalización RAF/MEK/ERK, las cuales podrían ofrecer rutas compensatorias de proliferación celular y supervivencia.

Si bien el análisis mutacional de determinados genes como *KRAS* y *BRAF* ha resultado en ocasiones útil para determinar por qué fallan determinadas terapias, muchas veces el análisis

exclusivo del estado mutacional de un gen no es suficiente para proporcionar una imagen completa de la actividad celular tan compleja que promueve el desarrollo de un tumor y que es responsable del tipo de respuesta a los tratamientos. Por este motivo, en los últimos años se ha focalizado el estudio no sólo en el estado mutacional de genes sino también en los niveles de expresión y actividad de proteínas críticas en el desarrollo de tumores. De la misma manera, se ha intentado hallar una relación entre los niveles de expresión y/o actividad de proteínas y el tipo de respuesta al tratamiento quimioterapéutico. En muchas ocasiones, se ha observado que la elevada expresión o actividad de determinada proteína se asocia con la resistencia/sensibilidad a un determinado tipo de tratamiento, a las que se han denominado “marcadores proteómicos” (Silvestri et al., 2013).

El siguiente objetivo de nuestro trabajo consistió en evaluar los niveles basales de ERK1/2 activa mediante el estudio de los niveles de fosforilación de esta proteína por Western blot y determinar si los niveles de fosfo-ERK1/2 podrían servir como marcador molecular de respuesta a AZD. Varios investigadores han tratado de abordar este estudio basados en la hipótesis de que los tumores que presentan niveles endógenos elevados de proteína ERK1/2 activa dependerían principalmente de la vía RAF/MEK/ERK para la proliferación y supervivencia celular y por ende, serían más sensibles a inhibidores de MEK1/2 (Sebolt-Leopold et al., 1999). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que los niveles basales en ausencia de suero (y por tanto endógenos), de fosfo-ERK1/2 no se relacionan con el grado de inhibición de proliferación celular (Figura 16). Por ejemplo, las líneas celulares HGUE-C-1 y Caco-2 presentan niveles endógenos elevados de fosfo-ERK1/2 y sin embargo, son muy resistentes al tratamiento con AZD. Asimismo, todas las líneas celulares sensibles a AZD presentan niveles basales o endógenos muy bajos de fosfo-ERK1/2 (Figura 16). Estos resultados corroboran los datos obtenidos en líneas celulares de adenocarcinoma de colon y otros tipos de tumores en los que se muestra que la activación basal de ERK1/2, no se correlaciona con la resistencia y por consiguiente, no serían suficientes para predecir la respuesta de los pacientes a inhibidores de MEK1/2 como AZD (Solit et al., 2006). Además, la inhibición de ERK1/2 por AZD tampoco resulta ser un marcador molecular de respuesta efectivo, ya que el tratamiento con AZD inhibe la fosforilación de ERK1/2 tanto en las líneas resistentes como en las sensibles, independientemente del tipo de respuesta a AZD (Figura 17).

Aproximadamente el 30% de los tumores de colon presentan mutaciones en el gen *PIK3CA* que codifica para la subunidad catalítica p110 $\alpha$  de la enzima PI3KI (Samuels and Velculescu,



2004). En los últimos tiempos, se ha intentado asociar las mutaciones en este gen con la resistencia a inhibidores de MEK1/2 (Wee et al., 2009). Sin embargo, en nuestro estudio no hemos encontrado una relación clara entre mutaciones en el gen *PIK3CA* y la resistencia a AZD, ya que líneas celulares como LS 174T tienen el gen mutado y son sensibles a AZD (Tabla 8). Por otra parte, otros trabajos han demostrado que líneas celulares con *KRAS* y *PIK3CA* mutado son más resistentes a inhibidores de MEK1/2 y la inhibición de *PIK3CA* es capaz de sensibilizar a las células al tratamiento con AZD (Wee et al., 2009). Asimismo, se ha observado también que líneas celulares con bajos niveles de p-ERK o que presentan simultáneamente una activación constitutiva de ERK1/2 y AKT1/2 son altamente resistentes a AZD (Balmanno et al., 2009). Estos resultados, en conjunto, muestran que la resistencia a AZD parecería estar asociada con una “firma” bioquímica más que con una mutación en solo un gen.

Como alternativa, investigamos si la activación de otros componentes de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K, además de la enzima PI3K, podría influir en la resistencia a AZD en líneas celulares de adenocarcinoma de colon. Para ello, se analizaron los niveles de fosforilación basal de las quinasas AKT1/2, p70S6K y RPS6 como marcadores de activación de esta ruta de señalización. Si bien no observamos una relación entre la activación de AKT1/2 y la resistencia a AZD, encontramos que las líneas celulares resistentes a AZD, HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1, presentan niveles endógenos elevados de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6 (Figura 20). Además, al tratar estas líneas celulares con AZD durante 2 o 24 horas, los niveles de fosforilación de estas proteínas no se ven afectados y permanecen prácticamente invariables (Figura 19). Estos resultados sugieren que la resistencia en estas células estaría asociada a niveles elevados de actividad basal de p70S6K y RPS6 y a la falta de inhibición de dicha actividad tras el tratamiento con AZD. Por el contrario, las líneas celulares sensibles a AZD expresan niveles basales mínimos de fosfo-p70S6K y fosfo-RPS6, que en ocasiones resultan ser prácticamente indetectables (Figura 20). Además, cuando estas células fueron tratadas con AZD, se observa una disminución de la fosforilación de estas proteínas bastante marcada (Figura 19).

Los datos anteriores nos llevaron a investigar si la inhibición farmacológica de la actividad de p70S6K y RPS6 sensibilizaría a las células resistentes al tratamiento con AZD. Para ello, se utilizaron dos inhibidores diferentes PF-4708671 y NVP-BEZ235 (BEZ). PF-4708671 es altamente selectivo para la quinasa p70S6K ya que estudios *in vitro* han mostrado que es capaz de inhibir dicha proteína con una  $K_i$  de 20 nM y una  $IC_{50}$  de 160 nM. Además, estudios de especificidad celulares muestran que PF-4708671 no inhibe la actividad de quinasas

pertenecientes a la misma familia a la que pertenece la quinasa p70S6K, denominada familia AGC (Pearce et al., 2010). Por su parte, BEZ es un inhibidor dual de la actividad de las quinasas PI3K y mTOR que ejerce su función inhibitoria interaccionando con el sitio de unión de ATP de estas enzimas. Estudios *in vivo* en modelos de tumores humanos han mostrado que dicho compuesto presenta altos niveles de tolerancia (Maira et al., 2008a). Si bien BEZ no es un inhibidor directo de las proteínas p70S6K y RPS6, la inhibición dual de PI3K y mTOR mediante BEZ ha mostrado bloquear también la actividad de la quinasa p70S6K y de RPS6, situadas por debajo de la quinasa mTOR en la vía de señalización (Baumann et al., 2009; Masuda et al., 2011; Leung et al., 2011).

En los estudios de combinación de AZD y BEZ, los experimentos control revelan que BEZ inhibe la fosforilación de p70S6K y RPS6 de forma efectiva en las líneas celulares resistentes seleccionadas para este estudio (HGUE-C-1 y DLD-1) (Figura 22a y Figura 23a). De forma interesante, la inhibición farmacológica de p70S6K y RPS6 mediante este fármaco sensibiliza a las células al tratamiento con AZD (Figura 22b y Figura 23b). Es interesante destacar que si bien la combinación de AZD+BEZ consigue revertir la resistencia en ambas líneas celulares (HGUE-C-1 y DLD-1), los estudios de ciclo celular (Figura 23) muestran que el efecto observado en cada tipo celular es diferente. En la línea celular DLD-1 se produce un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular (Figura 23b), de la misma forma como ocurría en líneas sensibles cuando éstas eran tratadas con AZD (Figura 15 y Tabla 6). Sin embargo, la combinación de fármacos en la línea celular HGUE-C-1 no produce acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> sino que provoca muerte celular (detectado por un aumento en la fase SubG<sub>1</sub> del ciclo celular) (Figura 23).

El hecho de que la combinación de compuestos en la línea celular HGUE-C-1 lleve a la muerte celular en vez de producir un bloqueo en el ciclo, puede deberse al siguiente motivo: estudios previos de Western blot realizados en nuestro laboratorio muestran que las líneas celulares HGUE-C-1 y Caco-2 presentan niveles bajos de proteína de retinoblastoma Rb en comparación con otras líneas celulares sensibles utilizadas en este trabajo (SW680, SW480 y HT-29) o la línea resistente HCT-15 (Anexo, Figura 42). Además, estudios de medición de la actividad de Rb también muestran que la actividad transcripcional de Rb en HGUE-C-1 y Caco-2 es menor en comparación con la línea celular sensible HT-29 (datos no mostrados). La proteína Rb es una proteína supresora de tumores que juega un papel esencial en la progresión del ciclo celular, regulando la transición desde la fase G<sub>1</sub> a S. Rb ejerce esta función uniéndose a una familia de factores de transcripción E<sub>2</sub>F e inhibiendo su actividad transcripcional. E<sub>2</sub>F, por su

parte, regula múltiples genes que participan en la síntesis del ADN y la progresión del ciclo celular. Así, la inactivación de E<sub>2</sub>F por Rb conduce al bloqueo de la expresión de estos genes, lo que lleva a una parada del ciclo. Cuando Rb es inactivado, no logra inhibir a E<sub>2</sub>F, por lo que E<sub>2</sub>F se activa y el ciclo celular progresa (Giacinti and Giordano, 2006).

De esta forma, las líneas celulares resistentes HGUE-C-1 y Caco-2 al presentar bajos niveles de expresión y actividad de la proteína Rb en comparación con otras células utilizadas en este estudio, podrían no ser capaces de sufrir un bloqueo en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular en respuesta a agentes quimioterapéuticos tales como el AZD y como consecuencia morirían directamente. De hecho, ensayos de proliferación MTT realizados en nuestro laboratorio en las diferentes líneas celulares muestran que el tratamiento con el inhibidor BEZ provoca acumulación en la fase G<sub>1</sub> de todas las líneas celulares a excepción de las líneas celulares HGUE-C-1 y Caco-2, que mueren directamente sin observarse una parada en el ciclo celular (Anexo, Figura 43).

Tras comprobar que la combinación de AZD+BEZ revierte la resistencia en las líneas celulares HGUE-C-1 y DLD-1, decidimos realizar los mismos tipos de experimentos empleando inhibidores más específicos. En el transcurso de este trabajo, el grupo de Pearce y colaboradores sintetiza y caracteriza el compuesto PF-4708671 (comercializado por Sigma-Aldrich y ToCris). PF-4708671 resultó ser un inhibidor altamente selectivo de la quinasa p70S6K, por lo que decidimos emplear dicho inhibidor en combinación con AZD. Debido a que no existen inhibidores específicos de la proteína RPS6 disponibles comercialmente, hemos realizado el estudio solamente con PF-4708671. Los experimentos control de Western blot muestran que el compuesto PF-4708671 suprime la fosforilación de uno de los sustratos más importantes de p70S6K, la proteína RPS6, lo que demuestra que dicho compuesto es capaz de inhibir el eje p70S6K/RPS6 de forma efectiva en las líneas celulares resistentes HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1. Sin embargo, PF-4708671 no suprime la fosforilación de su diana p70S6K sino por el contrario, los niveles de fosfo-p70S6K aumentan en presencia de dicho inhibidor (Figura 24a). En el trabajo publicado por Pearce y colaboradores en el que se sintetiza y caracteriza al compuesto PF-4708671, también se observa un aumento en los niveles de fosforilación de p70S6K en presencia de este compuesto. Estos autores postulan que el incremento en los niveles de fosforilación se podrían deber al siguiente mecanismo: p70S6K regula un sistema de retroalimentación negativo que inhibe la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. En este sistema, cuando la enzima p70S6K está sobreactivada, p70S6K fosforila el receptor de sustrato de

insulina, IRS 1 (*Insulin Receptor Substrate-1*), induciendo su degradación e inhibiendo la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K (Harrington et al., 2004; Shah et al., 2004). Al incubar las células con un inhibidor de p70S6K, se eliminaría este sistema de retroalimentación negativo. Sin embargo, estos autores no aseguran que este mecanismo sea el responsable del aumento en los niveles de fosforilación de p70S6K, ya que dicho aumento se observa a los pocos minutos de tratamiento con PF-4708671. Además tampoco fueron capaces de detectar fosforilación en el residuo Ser302 de IRS 1 tras el tratamiento con AZD (Pearce LR, trabajo no publicado). Sin embargo, a pesar de esto, en este trabajo queda claramente demostrado que el compuesto PF-4708671 es un inhibidor altamente selectivo de la enzima p70S6K y que suprime la respuesta de forma notable en su proteína diana más importante, la proteína RPS6.

Una vez comprobado que PF-4708671 suprime la actividad de su proteína diana, exploramos si la incubación de este compuesto con AZD era capaz de sensibilizar las líneas celulares resistentes HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1 al tratamiento con AZD. Al tratar los tres tipos celulares con AZD+PF-4708671, observamos que las células se hacen más sensibles al tratamiento (Figura 24b), lo que reafirmaría que la inhibición de la actividad de la quinasa p70S6K y como consecuencia RPS6, serían responsables, al menos en parte, de la resistencia a AZD.

En resumen, los experimentos de combinación de compuestos revelan que la inhibición específica y directa (mediante PF-4708671) o la inhibición indirecta (mediante BEZ) de la quinasa p70S6K y de RPS6, conduce a una sensibilización de las células al tratamiento con AZD. Estos datos permitirían concluir que una elevada actividad de p70S6K y RPS6 sería responsable, al menos en parte, de la resistencia a AZD en las líneas celulares HCT-15, HGUE-C-1 y DLD-1.

Sin embargo, el mecanismo de resistencia empleado por la línea celular HCT-15 parecería ser diferente. En este caso, la resistencia no estaría asociada a niveles basales elevados de fosforilación de p70S6K y de RPS6, como en el caso de las líneas celulares HGUE-C-1 y DLD-1. Como hemos visto, en la línea celular resistente HCT-15 la fosforilación basal de p70S6K y RPS6 es mínima y similar a los niveles observados en las líneas sensibles (Figura 20). Sin embargo, cuando estas células fueron tratadas con AZD durante 24 horas, se produce un aumento notorio en la fosforilación de p70S6K y RPS6 (Figura 19b), lo que indicaría que la resistencia en este caso, estaría asociada a un aumento en la actividad de p70S6K y RPS6 en

respuesta a AZD, y no a una actividad basal aumentada preexistente antes del tratamiento. Por este motivo, en este caso, el inhibidor PF no fue utilizado para inhibir la fosforilación preexistente en las células (como en el caso de las HGUE-C-1 y DLD-1) sino que fue utilizado para evitar el aumento en la fosforilación de p70S6K y RPS6 en respuesta a AZD.

Es claro entonces que existirían dos mecanismos diferentes de resistencia a AZD, uno mediado por un aumento basal en la actividad de p70S6K y RPS6 preexistente (sería el caso de HGUE-C-1, DLD-1 y Caco-2) y otro mediado por un aumento en la actividad de p70S6K y RPS6 en respuesta a AZD (sería el caso de la línea celular HCT-15).

En función de esto, una hipótesis que se podría postular es que las **líneas celulares resistentes HGUE-C-1, DLD-1 y Caco-2** tendrían la ruta PI3K/AKT/mTOR/p70S6K más activa y dependerían principalmente de esta vía para gobernar procesos tales como proliferación celular, progresión del ciclo celular, supervivencia, etc. Así, el bloqueo del eje RAF/MEK/ERK mediante AZD no sería suficiente para inhibir la proliferación de estas células, ya que éstas células dependerían prioritariamente de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K para crecer. Un resultado que apoya esta hipótesis es el hecho de que el tratamiento con AZD no consigue disminuir la fosforilación de la quinasa p70S6K y de RPS6 en las líneas celulares resistentes.

Por el contrario, en las **líneas celulares sensibles** (SW480, SW620 y HT-29) los niveles basales de fosforilación de p70S6K y RPS6 son prácticamente indetectables, lo que indicaría que éstas células no presentarían una “adicción” a la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K para proliferar y crecer. Así, la inhibición de la ruta RAF/MEK/ERK en estas células sería suficiente para bloquear la proliferación celular, ya que éstas células no tienen una ruta sobreactivada que compense la inhibición de la vía RAF/MEK/ERK, como ocurre en las células resistentes. Además, el tratamiento de estas células con AZD inhibe la fosforilación de las quinasas p70S6K y RPS6, lo que sugiere que AZD ejercería su efecto anti-tumoral mediante la inhibición de la vía RAF/MEK/ERK, así como también de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K.

Finalmente, en el caso de la **línea celular resistente HCT-15**, podríamos postular que en condiciones basales, las células tendrían la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K mínimamente activada, debido al bajo nivel de fosforilación basal de p70S6K y RPS6 (Figura 20). Sin embargo, en presencia de AZD el aumento en la actividad de estas proteínas se traduciría en un aumento de la actividad global de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K, y por consiguiente, las

células comenzarían a depender principalmente de dicha ruta para crecer y en estas condiciones serían refractarias al tratamiento con AZD.

Los resultados provenientes del estudio de ciclo celular en la línea HCT-15 apoyan esta idea (Figura 15 y Tabla 6). Hemos visto que el tratamiento con AZD durante 24 horas conduce a una pequeña acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular. Sin embargo, tras 48 y 72 horas de tratamiento, este efecto de acumulación desaparece y las células dejan de responder al fármaco. Por otra parte, los estudios de Western blot revelan que el tratamiento de la línea celular HCT-15 durante 24 horas produce un aumento en la fosforilación de p70S6K y RPS6. En función de estos resultados podríamos postular que en las etapas iniciales de tratamiento y hasta por lo menos durante 24 horas (tiempo en el cual se observa acumulación de las células en fase G<sub>1</sub> del ciclo y aumento en los niveles de p-p70S6K y p-RPS6), la línea celular HCT-15 es más susceptible al tratamiento y se comporta de manera similar a las células sensibles. Sin embargo, tras 24 horas de incubación con AZD, las células responden al estímulo agresor con un aumento en la fosforilación de p70S6K y RPS6. Sería a partir de ese momento cuando comienzan a depender prioritariamente de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K para crecer y como resultado dejan de responder a AZD. Este hecho se refleja en los estudios de ciclo celular que muestran que a partir de las 48 horas de tratamiento y hasta por lo menos las 72 horas, el efecto de acumulación desaparece y las células se comportan como resistentes.

En resumen, existirían dos mecanismos diferentes de resistencia al AZD. En el caso de las líneas celulares HGUE-C-1, DLD-1 y Caco-2, la resistencia estaría mediada por una activación basal pre-existente de p70S6K y RPS6 y por la falta de inhibición de esta actividad tras el tratamiento con AZD, mientras que en la línea celular HCT-15 la resistencia estaría mediada por un aumento en la activación de estas proteínas en respuesta a AZD.

Como hemos mencionado, tanto la quinasa p70S6K como RPS6 forman parte de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR/p70S6K. La quinasa p70S6K se considera que tiene capacidad oncogénica al estar implicada en la traducción de proteínas estimulada por mitógenos y nutrientes, progresión del ciclo celular, supervivencia y motilidad celular, entre otros (Meyuhas and Dreazen, 2009). Por su parte, la proteína RPS6 es una de las proteínas que forman parte de la subunidad 40S de los ribosomas. Dicha proteína fue descubierta en el año 1974 (Gressner and Wool, 1974) y desde entonces ha sido foco de atención en estudios que involucran la biogénesis de los ribosomas. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que RPS6 era la única proteína ribosomal



capaz de ser fosforilada en respuesta a estímulos nutricionales o mitogénicos. Sin embargo, en los últimos años se ha observado que además de RPS6 existen otras proteínas ribosomales que son reguladas por fosforilación (Wool, 1996).

Existe controversia respecto a si la fosforilación de la proteína RPS6 juega un papel en la regulación de la síntesis global de proteínas en mamíferos. Por ejemplo, en un estudio se obtuvieron ratones mutantes al sustituir los residuos de serina fosforilables de RPS6 por Alanina, por lo que la proteína RPS6 no podía ser fosforilada. En los fibroblastos embrionarios derivados de estos ratones (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*), se observó un aumento en la síntesis global de proteína respecto a MEFs salvajes. Es decir, que la fosforilación de la proteína RPS6 inhibiría la síntesis de proteínas en estas células (Ruvinsky et al., 2005).

Sin embargo, en otros casos se ha observado que la activación de p70S6K y como consecuencia, la activación de RPS6 está relacionada con un aumento en la traducción de un tipo de moléculas de ARN mensajero (ARNm) denominadas TOP (“*Terminal OligoPyrimidine*”). Este tipo de ARNm se caracteriza por contener una “cola” de oligopirimidinas en el extremo terminal 5’ y codifica la síntesis de proteínas que se asocian con el aparato traduccional, como proteínas ribosomales, factores de elongación, etc (Hornstein et al., 2001; Meyuhas, 2000). La inhibición de la fosforilación de RPS6 mediante rapamicina bloquea la traducción de este tipo de ARNm TOP (Meyuhas, 2000). Estos resultados en conjunto han llevado a plantear la hipótesis de que la fosforilación en RPS6 aumenta la afinidad de los ribosomas por los ARNm TOP y así, se facilita la iniciación de la traducción de este tipo de ARNm (Jefferies et al., 1994). Sin embargo, existen estudios, aunque escasos, que no apoyan esta idea. Por ejemplo, en líneas celulares de médula adrenal y otros tipos de células, la inhibición de la fosforilación de p70S6K y RPS6 no conduce al bloqueo en la traducción de los ARNm TOP (Stolovich et al., 2002; Stolovich et al., 2005; Tang et al., 2001).

Si bien los datos existentes en la literatura no han logrado definir exactamente el papel fisiológico de RPS6 activa, estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que el bloqueo de la expresión de RPS6 mediante ARNi en la línea resistente HGUE-C-1 induce la muerte celular (datos no mostrados), lo que indica que RPS6 desempeñaría un papel importante en la supervivencia y proliferación de estas células. Existen estudios que muestran que la proteína RPS6 se encuentra altamente expresada en tumores primarios de linfoma y a su vez, el bloqueo de su expresión mediante ARNsh (*short hairpin*) inhibe la proliferación de las células. Además,

la inhibición farmacológica de la actividad de RPS6 mediante rapamicina provoca una alteración en la traducción de los ARNm TOP, lo que indicaría que RPS6 está implicada en la traducción de este tipo de ARNm (Hagner et al., 2011). De acuerdo con estos resultados, no es sorprendente que en la línea celular HGUE-C-1 la activación de la proteína RPS6 pudiese estar asociada a una mayor traducción de los ARNm TOP y por tanto, a un aumento en la traducción de moléculas involucradas en la síntesis proteica.

Aunque la función fisiológica de la fosforilación de RPS6 no está bien definida, cada vez existen más estudios que relacionan la fosforilación de RPS6 y de p70S6K con la transformación maligna. Estudios realizados en tumores de cavidad oral y células tumorales de páncreas muestran que la fosforilación de la proteína RPS6 se asocia a etapas tempranas de la progresión tumoral (Khalailah et al., 2013; Chaisuparat et al., 2013). Asimismo, otros estudios han mostrado que la transformación tumoral está asociada a un aumento en los niveles de fosforilación de p70S6K. Por ejemplo, se ha realizado un estudio con 154 pacientes con cáncer colorrectal donde se determinaron los niveles de proteína total y fosforilada de moléculas clave de la vía PI3K/AKT/mTOR/p70S6K y se intentaron relacionar estos niveles con la etapa en la que se encontraba el tumor. Los niveles de fosforilación de p70S6K en las células tumorales resultaron ser más elevados respecto a la mucosa de colon normal (Johnson et al., 2010). Otro estudio en células de cáncer de mama ha revelado que los niveles de fosforilación de p70S6K eran más elevados comparado con células epiteliales mamarias normales. En este mismo estudio se observó que el 70% de los carcinomas de mama invasivos, el 100% de los tumores de mama en fase III y el 76% de los tumores de mama en fase IV presentaban niveles muy elevados de fosforilación de p70S6K (Lin et al., 2005).

En resumen, los resultados más relevantes de la primera parte de este trabajo de tesis revelan que los niveles basales elevados de p70S6K y RPS6 así como la falta de inhibición de los mismos en presencia de AZD podrían actuar como marcadores de resistencia a dicho fármaco, algo interesante desde el punto de vista clínico. Asimismo, otros tumores podrían presentar un mecanismo alternativo de resistencia basado en un aumento en la fosforilación de RPS6 y p70S6K en respuesta a AZD. Sin embargo, debido al bajo número de líneas celulares que presentaron este último comportamiento (n=1), este resultado requeriría ser confirmado mediante una ampliación en el número de muestras.



La identificación de biomarcadores de respuesta eficaces permitiría, en caso de que dicho fármaco fuera aprobado, predecir la respuesta de un tumor y/o paciente a la quimioterapia y basándose en ello seleccionar una terapia apropiada para cada tipo de paciente. En resumen, lograr explotar el uso de AZD de manera eficaz en el tratamiento del cáncer colorrectal. Los hallazgos logrados en la primera parte de este trabajo proporcionan una buena justificación para combinar AZD con inhibidores de p70S6K y RPS6 en tumores que presenten niveles basales elevados de p-p70S6K y p-RPS6. Por ende, es importante en estudios futuros explorar si esta terapia de combinación de fármacos sería capaz de revertir la resistencia en modelos animales.



## DISCUSIÓN II



La autofagia es un proceso catabólico conservado y controlado que ocurre en todas las células eucariotas. En condiciones basales, la autofagia tiene la importante función de mantener la homeostasis celular, ya que desempeña un papel en el control de calidad de las proteínas y orgánulos, evitando la acumulación de agregados de proteínas y orgánulos dañados. Sin embargo, la autofagia puede ser activada por encima de sus niveles basales en condiciones de estrés como la deprivación de nutrientes, la hipoxia y en respuesta a tratamientos quimioterapéuticos, entre otros (Tanida, 2011).

Un elevado número de trabajos muestran que la autofagia es inducida en respuesta a determinados agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, el papel desempeñado por este proceso frente al tratamiento puede ser diferente. En algunos casos, la autofagia protege al tumor frente al tratamiento, pero en ocasiones la autofagia parece contribuir a la acción citotóxica de determinados compuestos. A este último caso se le ha denominado “muerte celular autofágica”.

El objetivo primario de la segunda parte de este trabajo de tesis consistió en determinar si AZD era capaz de inducir autofagia en las líneas celulares humanas de adenocarcinoma de colon y de ser así, investigar el papel de la autofagia en respuesta al tratamiento. En la primera parte de este estudio, observamos mediante ensayos de proliferación, que algunas líneas celulares se mostraron resistentes al tratamiento con AZD mientras que otras resultaron altamente sensibles (Figura 14). Con la finalidad de comprender mejor el efecto antiproliferativo en las células sensibles, se realizaron estudios de ciclo celular en los que se observó que AZD provocaba una acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo (indicativo de un bloqueo en la proliferación) sin observarse indicios de muerte (Figura 15, Tablas 5 y 6). Cabe mencionar que los estudios de ciclo celular se llevaron a cabo utilizando una concentración de AZD de 1  $\mu$ M, concentración que ejerce predominantemente un efecto citoestático.

Por otra parte, en la mayor parte de los trabajos publicados sobre autofagia, se muestra que este proceso está estrechamente relacionado con la muerte celular y no con un bloqueo en la proliferación. Por esta razón, en primer lugar y antes de proceder a investigar si AZD inducía autofagia en las líneas tumorales de colon, investigamos si concentraciones de AZD mayores a 1  $\mu$ M provocaba muerte en las células. Para llevar a cabo este y posteriores estudios, hemos seleccionado la **línea celular resistente HGUE-C-1** y la **línea celular sensible SW480**. Para estudiar el efecto de AZD sobre la muerte celular, las células fueron tratadas con concentraciones

crecientes de AZD (1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) y posteriormente procesadas para realizar estudios de ciclo celular y de apoptosis mediante AnexinaV-IP.

Los estudios de ciclo celular en la **línea celular resistente HGUE-C-1** mostraron que no se producen alteraciones en ninguna de las fases del ciclo celular cuando AZD era utilizado a concentraciones de 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M y 10  $\mu$ M, lo que corrobora la elevada resistencia de estas células al tratamiento con AZD. Asimismo, los ensayos de apoptosis mediante AnexinaV-IP tampoco muestran una inducción de apoptosis en estas células (Figura 25).

Una interrogante que nos planteamos fue si AZD podría inducir autofagia en la línea resistente HGUE-C-1 y de ser así, si esta autofagia podría estar contribuyendo a la resistencia a AZD. Para la detección de autofagia se realizaron distintos tipos de experimentos, como la determinación de los niveles de proteínas autofágicas por Western blot, el estudio de la formación de Ogánulos Vesiculares Ácidos (O.V.A.s) y el estudio de localización de la proteína de fusión GFP-LC3.

Uno de los marcadores más ampliamente utilizado para la determinación de autofagia es la proteína LC3-II. Cuando la autofagia es inducida, LC3-I se conjuga covalentemente con la fosfatidiletanolamina (PE) para formar LC3-II. Este proceso de conjugación requiere de una serie de reacciones enzimáticas complejas (Ichimura et al., 2000; Hanada et al., 2007; Fujita et al., 2008b). Una vez sintetizada, LC3-II, se inserta en la membrana del autofagosoma, y por tanto, un aumento en los niveles de LC3-II en experimentos de Western Blot y la aparición de un puntillado característico en experimentos de transfección con la proteína de fusión GFP-LC3 son indicadores fiables para estimar un aumento en la formación de autofagosomas. Nuestros resultados revelaron que al tratar la línea celular resistente HGUE-C-1 con AZD no se detecta un aumento en los niveles totales de LC3-II (Figura 27), sugiriendo que AZD no promueve la formación de autofagosomas en estas células.

Otro marcador utilizado comúnmente para la detección de autofagia es la proteína p62 que se localiza en los autofagosomas y es degradada por autofagia. Por tal motivo, otra forma de comprobar la inducción de autofagia es mediante la detección de una disminución en los niveles totales de p62 por Western blot. En nuestro estudio observamos que AZD no altera los niveles de p62 tras 24, 48 y 72 horas de tratamiento, indicando que dicho compuesto no induce la degradación de esta proteína por autofagia (Figura 27).

Asimismo los estudios de formación de O.V.A.s y los ensayos de localización de GFP-LC3 tampoco mostraron un aumento en la formación de orgánulos ácidos ni una traslocación de la proteína de fusión GFP-LC3 desde el citosol a los autofagosomas tras el tratamiento (Figura 28 y 29, respectivamente). Estos resultados, en conjunto, indican que AZD no induce autofagia en la línea resistente HGUE-C-1, concluyendo que este proceso no desempeña un papel en la resistencia a AZD.

A continuación realizamos el mismo tipo de estudio en la **línea celular sensible SW480**. Es decir, investigamos el efecto de concentraciones crecientes de AZD (3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ) sobre la proliferación y muerte celular para posteriormente explorar si la autofagia juega un papel en la respuesta de estas células al tratamiento. De forma interesante, el efecto de AZD sobre la proliferación y muerte depende de la concentración de AZD utilizada, ya que concentraciones de AZD 1  $\mu\text{M}$ , llevan a una acumulación de las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular, con un mínimo aumento en la fase sub $G_1$ , mientras que concentraciones mayores (3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), conducen a un importante aumento en el porcentaje de células en la fase sub $G_1$  (Figura 26). Estos resultados indican que AZD 1  $\mu\text{M}$  actúa de forma predominantemente citoestática provocando un bloqueo en la proliferación y concentraciones mayores (3  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ ), tienen un efecto citotóxico que conduce a la muerte celular

En función de estos resultados, nos resultó interesante investigar si **1  $\mu\text{M}$**  de AZD (concentración a la que AZD ejerce un efecto citoestático en la línea celular sensible SW480) o **10  $\mu\text{M}$**  de AZD (concentración a la que AZD induce muerte celular) era capaz de inducir autofagia en la línea celular sensible SW480.

Curiosamente, el uso de **AZD 1  $\mu\text{M}$** , no induce un aumento en los niveles del marcador autofágico LC3-II ni una disminución en los niveles de proteína p62 (Figura 30). Asimismo, tampoco se observa una redistribución de la proteína GFP-LC3 desde el citosol hacia los autofagosomas (Figura 32), por lo que es posible afirmar que AZD utilizado a una concentración 1  $\mu\text{M}$  no induce autofagia en la línea celular SW480.

Aunque los resultados anteriores no dejan dudas que AZD utilizado a concentraciones 1  $\mu\text{M}$  no estimulan la autofagia, cuando analizamos la formación de O.V.A.s, observamos que AZD induce la formación de orgánulos ácidos, siendo este efecto muy marcado tras 48 horas de

tratamiento (Figura 31). Este resultado contradictorio se puede deber a que el análisis de O.V.A.s no es un análisis específico de autofagia y si bien en muchas ocasiones resulta de gran utilidad, presenta sus limitaciones. Esta técnica se basa en el uso del fluoróforo naranja de acridina, una base débil fluorescente capaz de difundir libremente a través de las membranas. Cuando dicho fluoróforo penetra en vesículas de naturaleza ácida, se protona y es retenido en su interior emitiendo fluorescencia en la zona roja del espectro. Así, un aumento en la intensidad de fluorescencia roja es proporcional al grado de acidez en la célula. Sin embargo, se debe tener en cuenta que además de los autofagolisosomas existen otros tipos de compartimentos ácidos en la célula que pueden retener el fluoróforo en su interior y emitir fluorescencia, tales como los endosomas, lisosomas y los anfisomas (resultado de la fusión de un endosoma con un autofosoma). Debido a que este tipo de ensayo no es específico para la detección de autofagia, es probable que el aumento en la fluorescencia observado en presencia de AZD se deba a otros procesos celulares no relacionados con la autofagia.

Otro aspecto llamativo de este estudio es que AZD 1  $\mu\text{M}$  no induce autofagia pero sí un bloqueo en la proliferación celular (Figura 26). El efecto de los inhibidores de MEK1/2 (incluyendo AZD) sobre la proliferación celular ha sido ampliamente demostrado en diversos tipos de tumores. Dicho efecto antiproliferativo se explica principalmente por la inhibición de la vía RAF/MEK/ERK. Está bien caracterizado que la proteína ERK1/2 actúa sobre infinidad de sustratos tanto citosólicos como nucleares. Entre estos sustratos se encuentran proteínas y factores de transcripción que participan en la transición de  $G_1$  a S del ciclo celular, lo que explicaría el efecto de acumulación de las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular. Sin embargo, en este caso, el efecto de bloqueo en la proliferación no se acompaña de una inducción en la autofagia, lo que posiblemente se deba a que las dianas afectadas por AZD a concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  no se encuentran directamente involucradas en la regulación de la autofagia.

El siguiente punto de este estudio consistió en investigar si AZD utilizado a una concentración de **10  $\mu\text{M}$**  (concentración que conduce a la muerte celular) era capaz de inducir autofagia en SW480. De forma interesante, en estas condiciones es posible observar muerte celular acompañada de autofagia. Para comprobar la inducción de autofagia, se realizaron ensayos similares a los anteriores y se analizó además el efecto de AZD sobre los niveles de los marcadores autofágicos, Beclina y del complejo Atg5-Atg12.

Atg5 es una proteína que se encuentra conjugada de manera constitutiva a Atg12 y dicha conjugación es esencial para la conversión de LC3-I a la forma lipídada LC3-II y formación del autofagosoma (Mizushima et al., 2001; Mizushima et al., 1998). Esto se debe a que el conjugado Atg5-Atg12 presenta actividad tipo E3 responsable de transferir la proteína LC3-I desde Atg3 (a la cual está unida) a la fosfatidiletanolamina para formar LC3-II (Fujita et al., 2008a; Hanada et al., 2007). En un estudio realizado en células madre de embrión se observó que en presencia de un estímulo autofágico como la deprivación de nutrientes, el conjugado Atg12-Atg5 se trasloca desde el citosol a la membrana de aislamiento (membrana precursora de la membrana del autofagosoma) y una vez formado el autofagosoma, se disocia de la membrana, lo que indica que dicho complejo juega un papel crítico en la formación del autofagosoma (Mizushima et al., 2001). Aunque no se conoce el mecanismo preciso de regulación de este complejo, algunos estudios han mostrado que la expresión del complejo Atg5-Atg12 aumenta en presencia de determinados agentes quimioterapéuticos (Yuk et al., 2009; Wang and Levine, 2011).

A partir de estos datos, nos resultó interesante investigar si en presencia de AZD se alteraban los niveles de expresión del complejo Atg5-Atg12 en las células SW480. Resulta interesante comprobar que la presencia de 10  $\mu\text{M}$  de AZD conduce a un aumento en los niveles de complejo Atg5-Atg12, efecto que se hace evidente tras 24 horas de incubación con AZD y es máximo tras 48 horas de tratamiento (Figura 33). Cabe mencionar que el aumento en los niveles de Atg5-Atg12 no es habitualmente utilizado como marcador de inducción de autofagia, debido al desconocimiento de su mecanismo exacto de regulación. Sin embargo, ya que hemos comprobado la inducción de autofagia en estas células utilizando otros marcadores autofágicos (ver más abajo) y debido a que el complejo Atg5-Atg12 es fundamental para la formación del autofagosoma, es probable que este aumento en los niveles de Atg5-Atg12 esté asociado a una inducción de la autofagia.

Otros marcadores autofágicos que resultaron alterados en presencia de AZD 10  $\mu\text{M}$  fueron p62 y Beclina 1 (Figura 33). Es interesante observar una clara disminución en los niveles de p62, evidente tras 24 horas de tratamiento y máxima tras 48 horas de incubación con AZD. Beclina 1 es una proteína que participa en las fases iniciales de la autofagia. Aunque no se conoce su mecanismo preciso de regulación, se sabe que Beclina 1 forma un complejo con la enzima PI3KIII que participa en la formación del autofagosoma. Diversos trabajos muestran que los niveles de expresión de Beclina 1 aumentan en respuesta a determinados estímulos autofágicos (Yuk et al., 2009). Se ha demostrado que para que se estimule la autofagia es necesario que se

haya formado el complejo Beclina-PI3KIII y que se hayan alcanzado niveles elevados de expresión de Beclina 1. Estos resultados sugieren que existe un determinado umbral en los niveles de Beclina 1 que debe ser alcanzado para desencadenar la autofagia. En nuestro estudio, hemos observado un marcado aumento en los niveles de expresión de Beclina 1 en respuesta a AZD (Figura 33). Es interesante notar que el aumento máximo ocurre tras 12 horas de tratamiento, mientras que el efecto máximo de degradación de p62 tiene lugar tras 48 horas de incubación con AZD. La razón de esta diferencia temporal en la expresión de Beclina 1 y p62 puede deberse a que Beclina 1 interviene en las fases iniciales de la autofagia mientras que la degradación de p62 ocurre en sus fases finales, esto es, tras la maduración del autofagosoma (Tanida, 2011). Por este motivo, decidimos realizar el estudio de Beclina a partir de 12 horas de incubación y no a partir de 24 horas como en el caso de los demás marcadores autofágicos.

Finalmente y para completar el estudio de marcadores autofágicos por Western blot investigamos el efecto de AZD sobre los niveles de LC3-II tras 48 horas de tratamiento. Es significativo observar un aumento muy marcado de LC3-II en las células SW480 tratadas con 10  $\mu$ M de AZD, indicando un aumento en la formación de autofagosomas (Figura 33).

La inducción de autofagia en la línea celular SW480 fue confirmada mediante el estudio de la formación de O.V.A.s y de localización de GFP-LC3. El ensayo de O.V.A.s muestra un claro aumento en la formación de orgánulos ácidos. Asimismo, el experimento de localización de GFP-LC3 demuestra una alteración en el patrón de distribución de la proteína de fusión GFP-LC3-II que pasa de tener una distribución difusa en el citosol a una distribución puntillada característica, reflejando la formación de autofagosomas. En resumen, estos resultados permiten afirmar que AZD utilizado a una concentración de 10  $\mu$ M induce autofagia en la línea celular sensible SW480.

Los resultados obtenidos nos resultaron bastante interesantes ya que no existen datos en la literatura que muestren una inducción de autofagia en respuesta a AZD. De hecho, este estudio sería el primero en demostrar que un inhibidor de MEK1/2 induce autofagia en células tumorales. Un estudio publicado por Shin y colaboradores, demuestra que la 5-metoxiflavanona (5-MF), un flavonoide de origen natural, induce autofagia en células de cáncer de colon. Curiosamente, la inducción de autofagia por 5-MF está mediada por una activación de la vía RAF/MEK/ERK, por lo que se utiliza un inhibidor de MEK1/2 para bloquear la autofagia (Shin



et al., 2011). De forma contraria, en nuestro estudio, la inducción de autofagia está asociada a una inhibición de la vía RAF/MEK/ERK mediada por AZD.

Aunque no existen datos publicados que muestren la inducción de autofagia en respuesta a inhibidores de MEK1/2, algunas publicaciones muestran que la autofagia es estimulada en respuesta a otros inhibidores de la vía RAF/MEK/ERK diferentes a AZD (Eum et al., 2013; Carr et al., 2013). Por ejemplo, se ha observado que Sorafenib, un inhibidor de RAF promueve la autofagia en células tumorales de hígado (Shimizu et al., 2012). Estos resultados y los propios obtenidos en nuestro laboratorio nos permiten sugerir que además de la clásica vía PI3K/AKT/mTOR (a través de mTOR) podrían existir otras rutas de señalización como RAF/MEK/ERK involucradas en la regulación de la autofagia.

Debido a que AZD utilizado a concentraciones de 10  $\mu$ M induce autofagia acompañada de muerte celular, nos resultó interesante investigar qué papel estaría jugando la autofagia en la muerte celular mediada por AZD. En este aspecto existe gran controversia en la literatura. Existen diversos trabajos que muestran que la autofagia tiene un papel protector frente al tratamiento con determinados agentes quimioterapéuticos. Por ejemplo, se ha observado que BEZ (inhibidor dual de mTOR y PI3K) induce apoptosis y autofagia en células tumorales de pulmón. Al combinar BEZ con CQ se potencia la muerte celular por apoptosis, lo que indicaría que la autofagia funciona como un mecanismo protector frente al agente antitumoral (Xu et al., 2011). De forma contraria, otros trabajos muestran que la autofagia funciona como mecanismo de muerte y contribuye a la destrucción de las células tumorales. Por ejemplo, el harmol, un alcaloide de origen natural, induce apoptosis y autofagia en células tumorales de pulmón y la combinación de harmol con 3-MA inhibe la muerte celular inducida por harmol, indicando que la autofagia contribuye a la muerte celular (Abe et al., 2011; Yu et al., 2004).

El siguiente paso en nuestro estudio fue entonces investigar qué papel juega la autofagia en la muerte celular inducida por AZD. Para ello, utilizamos los inhibidores de autofagia BAF, CQ y 3-MA. Como se detalló en la introducción, si bien el mecanismo específico de acción de BAF y CQ es diferente, ambos compuestos se caracterizan por inhibir las fases finales de la autofagia. Más concretamente, CQ y BAF provocan una alcalinización en los lisosomas y como consecuencia se bloquea la fusión lisosoma-autofagosoma y se evita la degradación de los componentes del autofagosoma como LC3-III. Por ello, en la práctica, la inhibición por BAF y CQ puede ser detectada por un aumento en los niveles de LC3-II por Western Blot.

En nuestro estudio, los experimentos control por Western blot muestran que tanto BAF como CQ inhiben la autofagia de forma eficiente, ya que los niveles de LC3-II aumentan de manera notable tanto en ausencia como en presencia de AZD (Figura 37). De forma interesante, la inhibición de autofagia mediante BAF y CQ potencia la muerte celular inducida por AZD (Figuras 38 y 39, respectivamente). Los estudios de ciclo celular muestran que la incubación de las células con AZD+BAF o AZD+CQ potencian la muerte celular inducida por AZD en un 17,0% y 24,7%, respectivamente. De forma semejante, los ensayos de apoptosis mediante tinción con AnexinaV-IP muestran un aumento en la muerte celular cuando las células son incubadas en presencia de AZD+BAF o AZD+CQ. Estos resultados, en conjunto sugieren que la autofagia tiene un mecanismo claramente protector.

Un estudio realizado en células de glioma humanas muestra que el efecto de la inhibición de autofagia sobre la citotoxicidad de imatinib depende de la fase de la autofagia que es bloqueada. Así, si la autofagia es inhibida en una fase tardía utilizando BAF o RTA203 (otro inhibidor de V ATPasa) se observa una potenciación del efecto citotóxico del imatinib. Sin embargo, si la autofagia es inhibida en sus fases más tempranas se atenúa la citotoxicidad mediada por imatinib (Shingu et al., 2009b). En función de estos resultados, nos resultó interesante observar el efecto de la citotoxicidad mediada por AZD en presencia de un compuesto que inhibiera las fases iniciales de la autofagia. Para ello, utilizamos 3-MA, el mismo compuesto utilizado por Takashi y colaboradores.

En nuestro estudio, la incubación de las células con AZD+3-MA conduce a un aumento en la muerte celular inducida por AZD (Figura 40). Sin embargo, este aumento es poco significativo y mucho menor comparado con el efecto producido por BAF y CQ. Esto quizá se deba a que 3-MA a la concentración utilizada no produce una inhibición muy notable de la autofagia. De hecho, los experimentos control muestran una disminución no significativa en la formación de O.V.A.s en las células incubadas con AZD+3-MA respecto a las células incubadas con AZD exclusivamente (disminución del 8%) (Figura 37). Además si comparamos el efecto de 3-MA con el efecto de BAF, observamos que la incubación con AZD+BAF provoca una disminución muy marcada en la formación de O.V.A.s respecto a la incubación con AZD exclusivamente (36,6%) (Figura 37). Por otra parte, CQ produce una disminución en la formación de O.V.A.s menor respecto al uso de BAF (disminución del 13%) pero mayor respecto al uso de 3-MA como inhibidor (Figura 37). Además, los experimentos de Western blot muestran que el efecto del

bloqueo de la autofagia cuando se utiliza BAF o CQ como inhibidores (indicado por la acumulación de LC3-II) es mucho más marcado en comparación con el uso de 3-MA (indicado por una disminución en los niveles de LC3-II) (Figura 37).

Estos resultados indican que 3-MA no es tan eficiente como inhibidor de autofagia a la concentración utilizada (3mM). Una posibilidad para lograr un efecto inhibitorio mayor podría haber sido utilizado una concentración de 3-MA más elevada. Sin embargo, esto no fue posible debido a que el uso de concentraciones mayores del compuesto comprometería seriamente la viabilidad de las células (Anexo, Figura 44). Es importante destacar que antes de comenzar a trabajar con los inhibidores BAF, CQ y 3-MA, hemos realizado ensayos de proliferación de MTT para seleccionar aquella concentración máxima de inhibidor que no comprometiera la viabilidad celular (Anexo, Figura 44). En el caso de 3-MA, decidimos utilizar una concentración de 3 mM, pues concentraciones mayores ejercían un efecto antiproliferativo importante. Además, se ha observado que la 3-MA a las concentraciones normalmente utilizadas para inhibir autofagia (en el rango de mM) inhibe otras quinasas (además de la PI3KIII) y como resultado se alteran otros procesos celulares como el metabolismo del glucógeno, la acidificación de los lisosomas, la endocitosis y la transición de permeabilidad mitocondrial. Por tanto, el uso de concentraciones muy elevadas de 3-MA ocasionaría efectos colaterales muy importantes (Caro et al., 1988; Punnonen et al., 1994; Xue et al., 2002).

La falta de inhibición o inhibición ineficiente de la autofagia por 3-MA podría deberse a que la 3-MA no es capaz de discriminar entre la PI3KIII y la PI3KI en estas células (Kong and Yamori, 2008; Knight and Shokat, 2007). Como se describió detalladamente en la introducción, la PI3KI forma parte de la vía PI3K/AKT/mTOR y por tanto una inhibición de PI3KI conduce a la inhibición de mTOR y como resultado a la activación de autofagia. En resumen, 3-MA tendría un papel contradictorio en cuanto a la regulación de autofagia. Por un lado, 3-MA inhibe la autofagia (por inhibición de PI3KIII) y por otro lado la activa (por inhibición de PI3KI). Un estudio realizado por Wu y colaboradores investiga el efecto inhibitorio de la 3-MA sobre las enzimas PI3KI y PI3KIII. Curiosamente, observaron que la 3-MA inducía la autofagia en condiciones ricas de nutrientes e inhibía la autofagia inducida por privación de nutrientes. De forma interesante, observaron que la inducción de autofagia por 3-MA se debía a una inhibición continua de la PI3KI (se induce autofagia) y a una inhibición transitoria de PI3KIII (se inhibe autofagia) con lo que el efecto global era una estimulación en la autofagia (Wu et al., 2010). Una hipótesis que podríamos entonces plantear es que en nuestro modelo celular (SW480), la 3-MA

estuviera inhibiendo ambas enzimas y como resultado, la inhibición de la autofagia mediada por PI3KIII no sería tan eficiente comparado con el uso de otros inhibidores como BAF o CQ.

Sin embargo, a pesar de los inconvenientes del uso de 3-MA, en algunos tipos de tumores se han obtenido resultados satisfactorios utilizando 3-MA como inhibidor de autofagia. Cabe mencionar que en estos estudios las células fueron incubadas con 3-MA durante tiempos prolongados (24 horas) (Li et al., 2010; Li et al., 2009; Shingu et al., 2009a). En resumen podemos concluir que el efecto inhibitorio de 3-MA sobre la autofagia podría depender de varios factores como las condiciones del experimento, concentración utilizada, tiempo de incubación, etc. Por tanto, se debe tener mucha precaución cuando se utiliza este fármaco como inhibidor de autofagia.

Si bien los resultados obtenidos con 3-MA no fueron prometedores, la inhibición de la autofagia mediante BAF y CQ resultó muy eficiente y su combinación con AZD potencia la muerte celular inducida por AZD. Asimismo, la incubación de las células con el inductor clásico de autofagia, rapamicina, provoca una mayor supervivencia de las células. En conjunto, estos resultados indican que la autofagia tiene un papel claramente protector en estas células. El papel protector de la autofagia puede deberse a múltiples mecanismos. Por ejemplo, es claro el papel de la autofagia en la eliminación de orgánulos dañados en las células. En el caso de AZD, este compuesto utilizado a concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  induce muerte celular, lo que probablemente conduce al daño de orgánulos, como las mitocondrias. Las células podrían entonces activar la autofagia como mecanismo de protección con la finalidad de eliminar las mitocondrias dañadas. Así, la utilización inhibidores de la autofagia podría estar evitando este proceso de “limpieza” y como resultado se potenciaría la muerte celular inducida por AZD. En el caso de concentraciones más bajas de AZD (1  $\mu\text{M}$ ) ocurre un bloqueo en la proliferación celular en ausencia de autofagia. En este caso se podría postular que frente a una menor intensidad del estímulo agresor, la célula no requiere poner en marcha la maquinaria autofágica como mecanismo protector. En resumen, estos resultados sugieren que la combinación de inhibidores de autofagia como CQ y BAF con AZD podría constituir una estrategia terapéutica interesante para potenciar la muerte de células tumorales en las células sensibles.

# CONCLUSIONES



1) La proliferación de las líneas celulares humanas de adenocarcinoma colorrectal se ve afectada por el inhibidor de MEK1/2, AZD6244, de tal manera que se pueden clasificar de acuerdo a su valor de  $IC_{50}$  en sensibles ( $IC_{50} \leq 1\mu M$ ) y resistentes ( $IC_{50} \geq 1\mu M$ ). El efecto antiproliferativo de AZD6244 en las líneas celulares sensibles es debido a una acumulación de las células en la fase  $G_1$  del ciclo celular. En cambio, las líneas celulares resistentes no experimentan acumulación en ninguna de las fases del ciclo celular.

2) AZD6244 inhibe la formación de colonias (crecimiento independiente de anclaje) de manera muy notable en las líneas celulares sensibles LS 174T y HT-29. Sin embargo, en las líneas celulares resistentes DLD-1 y HCT-15 el efecto inhibitorio de AZD6244 es mucho menor, lo que corrobora la elevada resistencia que presentan estas células al fármaco.

3) El compuesto AZD6244 inhibe la fosforilación de la diana de MEK1/2, ERK1/2, y esta inhibición se mantiene en el tiempo, tanto en las líneas celulares sensibles como resistentes, por lo que la resistencia a AZD6244 no parece estar asociada a una falta de inhibición de la actividad de MEK1/2. Asimismo, tampoco se observa una relación entre la activación basal de ERK1/2 y la resistencia a AZD6244.

4) El análisis de los genes *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* indica que no existe una estrecha asociación entre el estado mutacional de estos genes y la sensibilidad a AZD6244 en las líneas celulares de adenocarcinoma colorrectales estudiadas.

5) AZD6244 inhibe la fosforilación de S6K y RPS6 en las líneas celulares sensibles pero no en las líneas celulares resistentes HGUE-C-1, Caco-2, DLD-1 y HCT-15. En el caso de ésta última, cuyos niveles basales de S6K y RPS6 son mínimos, se observa incluso un aumento en los niveles de fosforilación de estas proteínas tras el tratamiento.

6) Los elevados niveles de fosforilación basal de S6K y RPS6 que presentan las células resistentes HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 podrían ser la causa de la ausencia de efecto de AZD6244 en la fosforilación y por tanto, activación de dichas moléculas en estas células.

7) En las líneas celulares HGUE-C-1, Caco-2 y DLD-1 la resistencia parece estar mediada por una activación basal preexistente de S6K y RPS6 y por la falta de inhibición de esta actividad tras el tratamiento con AZD6244, mientras que en la línea celular HCT-15 la

resistencia estaría mediada por un aumento en la activación de estas proteínas en respuesta al tratamiento con AZD6244.

8) La combinación de AZD6244 con inhibidores directos e indirectos de S6K y RPS6 produce una reversión de la resistencia en las líneas celulares resistentes HGUE-C-1, DLD-1 y HCT-15.

9) En la línea celular HGUE-C-1, AZD6244 no induce acumulación de las células en ninguna de las fases del ciclo celular, ni muerte celular a ninguna de las concentraciones utilizadas, lo que es indicativo de la elevada resistencia de estas células al tratamiento. Además, AZD6244 no induce autofagia en esta línea celular, sugiriendo que este proceso no estaría involucrado en la resistencia al tratamiento con el fármaco.

10) En la línea celular sensible SW480, AZD6244 tiene un efecto prioritariamente citoestático a bajas concentraciones, ya que produce una acumulación de las células en la fase G<sub>1</sub> del ciclo celular, pero no se observa inducción de autofagia. Sin embargo, a concentraciones altas, AZD6244 actúa de forma citotóxica, provocando muerte celular acompañada de una inducción de autofagia.

11) La muerte celular inducida por altas concentraciones de AZD6244 aumenta cuando AZD6244 es utilizado en combinación con los inhibidores de autofagia Bafilomicina, Cloroquina o 3-Metiladenina. Sin embargo, el aumento de la muerte celular en presencia de 3-Metiladenina es poco significativo lo que puede deberse a que este compuesto no es un inhibidor eficaz de autofagia en estas células y en estas condiciones experimentales.

12) Altas concentraciones de AZD6244 en combinación con el inductor clásico de autofagia, rapamicina, producen un aumento en la supervivencia de las células. Por tanto, la autofagia podría estar actuando como mecanismo protector frente al tratamiento con AZD6244.

13) El uso de inhibidores de autofagia en combinación con el inhibidor de MEK1/2, AZD6244, podría constituir una herramienta terapéutica interesante para sensibilizar las células de carcinoma de colon al tratamiento con inhibidores de MEK1/2.



1) The proliferation of human colorectal adenocarcinoma cell lines is affected by the MEK1/2 inhibitor, AZD6244, in such a way that they can be classified according to their  $IC_{50}$  value in sensitive ( $IC_{50} \leq 1 \mu M$ ) and resistant ( $IC_{50} \geq 1 \mu M$ ) cell lines. The antiproliferative effect of AZD6244 on sensitive cell lines is due to an accumulation of cells in the  $G_1$  phase of the cell cycle. However, resistant cell lines do not undergo accumulation in any phase of the cell cycle.

2) AZD6244 inhibits colony formation (anchorage-independent growth) to a great extent in the sensitive cell lines LS 174T and HT-29. Nevertheless, in the resistant cell lines DLD-1 and HCT-15, the AZD6244 inhibitory effect is slighter, corroborating that these cells are highly resistant to this drug.

3) AZD6244 inhibits phosphorylation of the target of MEK1/2, ERK1/2, over time in both sensitive and resistant cell lines, indicating that resistance to AZD6244 is not associated with a lack of inhibition of MEK1/2. Likewise, there is no association between ERK1/2 basal activation and resistance to AZD6244.

4) Analysis in *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* genes show that there is not a close association between the mutational status of these genes and sensitivity to AZD6244 in the colorectal carcinoma cell lines studied.

5) AZD6244 inhibits S6K and RPS6 phosphorylation in sensitive cell lines but not in the HGUE-C-1, Caco-2, DLD-1 and HCT-15 resistant cell lines. In the case of the latter, whose S6K and RPS6 basal phosphorylation levels are minimal, an increase in phosphorylation of these proteins after treatment can be observed.

6) The high basal phosphorylation levels of S6K and RPS6 in the HGUE-C-1, Caco-2 and DLD-1 resistant cells could be responsible for the lack of AZD6244 inhibitory effect on S6K and RPS6 phosphorylation and thus, activation of these molecules in these cells.

7) In HGUE-C-1, DLD-1 and Caco-2 cells, resistance may be mediated by a pre-existing basal activation of S6K and RPS6 and by lack of inhibition of this activity after AZD6244 treatment, whereas in HCT-15 cells, resistance may be mediated by an increase in activation of these proteins in response to AZD6244 treatment.



8) The combination of AZD6244 with S6K and RPS6 direct and indirect inhibitors leads to a reversal of resistance in HGUE-C-1, DLD-1 and HCT-15 cells.

9) In the HGUE-C-1 resistant cell line, AZD6244 does not induce accumulation of cells in any phase of the cell cycle, nor cell death at any concentration used, which is indicative of the high resistance of these cells to treatment. Moreover, AZD6244 does not induce autophagy in this cell line, suggesting that this process is not involved in resistance to drug treatment.

10) In SW480 sensitive cell line, low concentrations of AZD6244 cause a cytostatic effect, as the cells accumulate in the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle, but induction of autophagy is not observed. However, at higher concentrations, AZD6244 acts as a cytotoxic drug, leading to cell death which is accompanied by autophagy induction.

11) Cell death induced by high concentrations of AZD6244 is increased when this drug is used in combination with autophagy inhibitors such as Bafilomycin, Chloroquine or 3-Methyladenine. However, the increase in cell death in the presence of 3-Methyladenine is slightly significant, which could be due to the fact that this compound is not an effective autophagy inhibitor in these cells and under these experimental conditions.

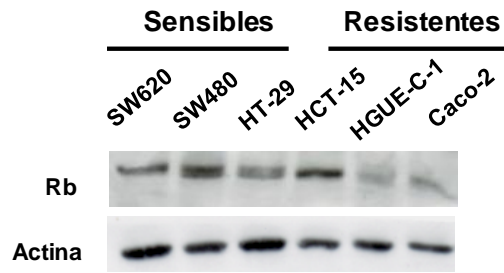
12) High concentrations of AZD6244 used in combination with the classical autophagic inductor agent, rapamycin, produce an increase in cell survival. These results suggest that autophagy could be acting as a protective mechanism in response to AZD6244 treatment.

13) The use of autophagy inhibitors in combination with the MEK1/2 inhibitor, AZD6244, could be an interesting therapeutic tool for sensitizing colon carcinoma cells to treatment with MEK1/2 inhibitors.

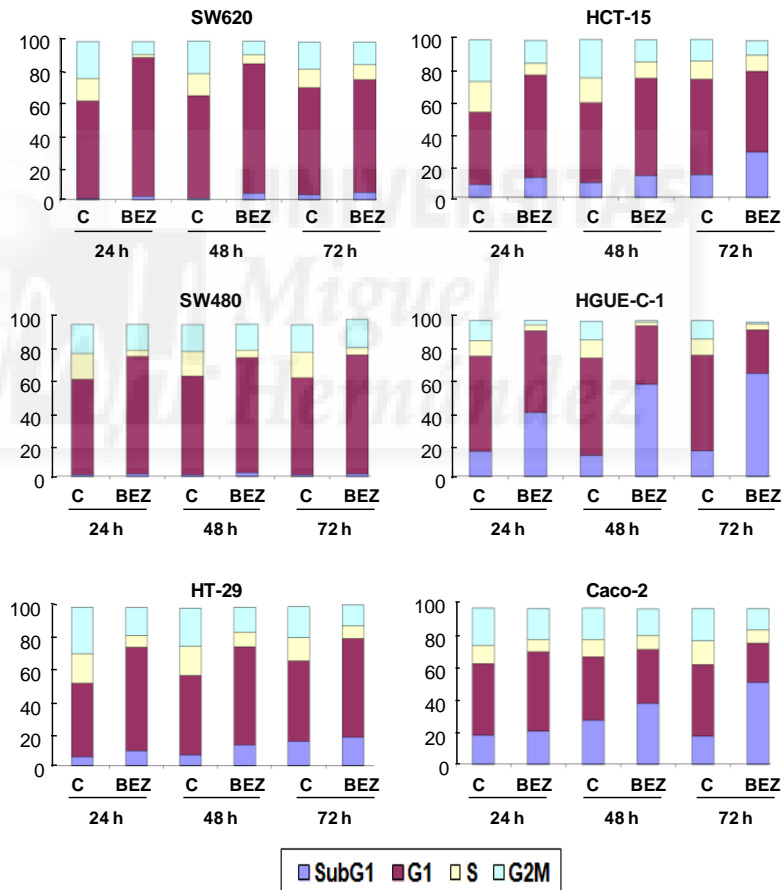


ANEXO

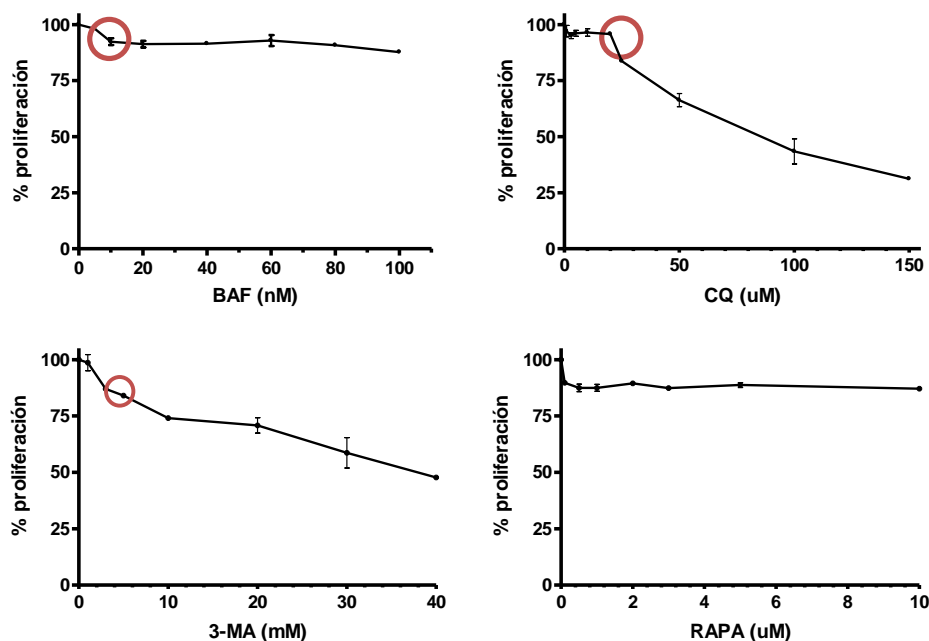




**Figura 42: Niveles de expresión de la proteína Retinoblastoma (Rb) en las líneas celulares sensibles y resistentes a AZD.** Las células fueron sembradas en placas de Petri y tras 48 horas de crecimiento, se obtuvieron los extractos de proteína que se analizaron por Western blot. En la figura se muestra un Western blot representativo de al menos tres experimentos ( $n \geq 3$ ). La proteína  $\beta$ -actina se utilizó como control de carga.



**Figura 43: Efecto de BEZ235 (BEZ) sobre la distribución de las células en las fases del ciclo celular (SubG<sub>1</sub>, G<sub>1</sub>, S y G<sub>2</sub>M).** Las líneas celulares de adenocarcinoma de colon fueron incubadas con 1  $\mu$ M BEZ durante 24, 48 y 72 horas y procesadas para su posterior análisis de distribución del contenido de ADN en las distintas fases del ciclo celular por citometría de flujo.



**Figura 44: Efecto de BAF, CQ, 3-MA y RAPA sobre la proliferaci3n celular en la lnea celular SW480.** Las c3lulas fueron tratadas con medio conteniendo concentraciones crecientes de los diferentes compuestos durante 24 horas (en el caso de BAF y CQ) y durante 48 horas (en el caso de 3-MA y RAPA). La proliferaci3n celular fue determinada mediante el m3todo de MTT tal y como se describe en el apartado de Materiales y M3todos. Cada punto representa el promedio de la proliferaci3n  $\pm$  el error est3ndar de la media (SEM) de diferentes experimentos ( $n \geq 6$ ).

Miguel  
Hern3ndez

## Bibliografía

Abe,A., Yamada,H., Moriya,S., and Miyazawa,K. (2011). The beta-carboline alkaloid harmol induces cell death via autophagy but not apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1264-1272.

Al-Kuraya,K., Novotny,H., Bavi,P., Siraj,A.K., Uddin,S., Ezzat,A., Sanea,N.A., Al-Dayel,F., Al-Mana,H., Sheikh,S.S., Mirlacher,M., Tapia,C., Simon,R., Sauter,G., Terracciano,L., and Tornillo,L. (2007). HER2, TOP2A, CCND1, EGFR and C-MYC oncogene amplification in colorectal cancer. *J. Clin. Pathol.* 60, 768-772.

Albanopoulos,K., Armakolas,A., Konstadoulakis,M.M., Leandros,E., Tsiompanou,E., Katsaragakis,S., Alexiou,D., and Androulakis,G. (2000). Prognostic significance of circulating antibodies against carcinoembryonic antigen (anti-CEA) in patients with colon cancer. *Am. J. Gastroenterol.* 95, 1056-1061.

Alessi,D.R., Saito,Y., Campbell,D.G., Cohen,P., Sithanandam,G., Rapp,U., Ashworth,A., Marshall,C.J., and Cowley,S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.* 13, 1610-1619.

Allegra,C.J., Jessup,J.M., Somerfield,M.R., Hamilton,S.R., Hammond,E.H., Hayes,D.F., McAllister,P.K., Morton,R.F., and Schilsky,R.L. (2009). American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 2091-2096.

Andjelkovic,M., Alessi,D.R., Meier,R., Fernandez,A., Lamb,N.J., Frech,M., Cron,P., Cohen,P., Lucocq,J.M., and Hemmings,B.A. (1997). Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 272, 31515-31524.

Andre,T., Boni,C., Mounedji-Boudiaf,L., Navarro,M., Tabernero,J., Hickish,T., Topham,C., Zaninelli,M., Clingan,P., Bridgewater,J., Tabah-Fisch,I., and de,G.A. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 350, 2343-2351.

Andre,T., Sargent,D., Tabernero,J., O'Connell,M., Buyse,M., Sobrero,A., Misset,J.L., Boni,C., and de,G.A. (2006). Current issues in adjuvant treatment of stage II colon cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 13, 887-898.

Apel,A., Herr,I., Schwarz,H., Rodemann,H.P., and Mayer,A. (2008). Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.* 68, 1485-1494.

Armand,J.P., Ducreux,M., Mahjoubi,M., Abigeres,D., Bugat,R., Chabot,G., Herait,P., de,F.M., and Rougier,P. (1995). CPT-11 (irinotecan) in the treatment of colorectal cancer. *Eur. J. Cancer* 31A, 1283-1287.

Arrington,A.K., Heinrich,E.L., Lee,W., Duldulao,M., Patel,S., Sanchez,J., Garcia-Aguilar,J., and Kim,J. (2012). Prognostic and Predictive Roles of KRAS Mutation in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 12153-12168.

Arteaga,C.L. (2006). EGF receptor mutations in lung cancer: from humans to mice and maybe back to humans. *Cancer Cell* 9, 421-423.

Atkin,W.S., Edwards,R., Kralj-Hans,I., Wooldrage,K., Hart,A.R., Northover,J.M., Parkin,D.M., Wardle,J., Duffy,S.W., and Cuzick,J. (2010). Once-only flexible sigmoidoscopy screening in prevention of colorectal cancer: a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 375, 1624-1633.

- Bader,A.G., Kang,S., and Vogt,P.K. (2006). Cancer-specific mutations in PIK3CA are oncogenic in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 1475-1479.
- Balmanno,K., Chell,S.D., Gillings,A.S., Hayat,S., and Cook,S.J. (2009). Intrinsic resistance to the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) is associated with weak ERK1/2 signalling and/or strong PI3K signalling in colorectal cancer cell lines. *Int. J. Cancer*. 2009. Nov. 15. ;125. (10):2332. -41. 125, 2332-2341.
- Barber,T.D., Vogelstein,B., Kinzler,K.W., and Velculescu,V.E. (2004). Somatic mutations of EGFR in colorectal cancers and glioblastomas. *N. Engl. J. Med.* *351*, 2883.
- Barlund,M., Forozan,F., Kononen,J., Bubendorf,L., Chen,Y., Bittner,M.L., Torhorst,J., Haas,P., Bucher,C., Sauter,G., Kallioniemi,O.P., and Kallioniemi,A. (2000). Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarray analysis. *J. Natl. Cancer Inst.* *92*, 1252-1259.
- Baumann,P., Mandl-Weber,S., Oduncu,F., and Schmidmaier,R. (2009). The novel orally bioavailable inhibitor of phosphoinositol-3-kinase and mammalian target of rapamycin, NVP-BEZ235, inhibits growth and proliferation in multiple myeloma. *Exp. Cell Res.* *315*, 485-497.
- Bekri,S., Adelaide,J., Merscher,S., Grosgeorge,J., Caroli-Bosc,F., Perucca-Lostanlen,D., Kelley,P.M., Pebusque,M.J., Theillet,C., Birnbaum,D., and Gaudray,P. (1997). Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet. Cell Genet.* *79*, 125-131.
- Bellacosa,A., de,F.D., Godwin,A.K., Bell,D.W., Cheng,J.Q., Altomare,D.A., Wan,M., Dubeau,L., Scambia,G., Masciullo,V., Ferrandina,G., Benedetti,P.P., Mancuso,S., Neri,G., and Testa,J.R. (1995). Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* *64*, 280-285.
- Bennouna,J., Lang,I., Valladares-Ayerbes,M., Boer,K., Adenis,A., Escudero,P., Kim,T.Y., Pover,G.M., Morris,C.D., and Douillard,J.Y. (2011). A Phase II, open-label, randomised study to assess the efficacy and safety of the MEK1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) versus capecitabine monotherapy in patients with colorectal cancer who have failed one or two prior chemotherapeutic regimens. *Invest New Drugs* *29*, 1021-1028.
- Bianco,R., Shin,I., Ritter,C.A., Yakes,F.M., Basso,A., Rosen,N., Tsurutani,J., Dennis,P.A., Mills,G.B., and Arteaga,C.L. (2003). Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* *22*, 2812-2822.
- Bjorkoy,G., Lamark,T., Brech,A., Outzen,H., Perander,M., Overvatn,A., Stenmark,H., and Johansen,T. (2005). p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell Biol.* *171*, 603-614.
- Blalock,W.L., Weinstein-Oppenheimer,C., Chang,F., Hoyle,P.E., Wang,X.Y., Algate,P.A., Franklin,R.A., Oberhaus,S.M., Steelman,L.S., and McCubrey,J.A. (1999). Signal transduction, cell cycle regulatory, and anti-apoptotic pathways regulated by IL-3 in hematopoietic cells: possible sites for intervention with anti-neoplastic drugs. *Leukemia* *13*, 1109-1166.
- Boland,C.R., Thibodeau,S.N., Hamilton,S.R., Sidransky,D., Eshleman,J.R., Burt,R.W., Meltzer,S.J., Rodriguez-Bigas,M.A., Fodde,R., Ranzani,G.N., and Srivastava,S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* *58*, 5248-5257.

- Bowman,E.J., Siebers,A., and Altendorf,K. (1988). Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7972-7976.
- Bradford,M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Broderick,D.K., Di,C., Parrett,T.J., Samuels,Y.R., Cummins,J.M., McLendon,R.E., Fults,D.W., Velculescu,V.E., Bigner,D.D., and Yan,H. (2004). Mutations of PIK3CA in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res.* 64, 5048-5050.
- Burt,R.W., Leppert,M.F., Slattery,M.L., Samowitz,W.S., Spirio,L.N., Kerber,R.A., Kuwada,S.K., Neklason,D.W., DiSario,J.A., Lyon,E., Hughes,J.P., Chey,W.Y., and White,R.L. (2004). Genetic testing and phenotype in a large kindred with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 127, 444-451.
- Byun,D.S., Cho,K., Ryu,B.K., Lee,M.G., Park,J.I., Chae,K.S., Kim,H.J., and Chi,S.G. (2003). Frequent monoallelic deletion of PTEN and its reciprocal association with PIK3CA amplification in gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* 104, 318-327.
- Cadigan,K.M. and Liu,Y.I. (2006). Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* 119, 395-402.
- Carew,J.S., Nawrocki,S.T., Kahue,C.N., Zhang,H., Yang,C., Chung,L., Houghton,J.A., Huang,P., Giles,F.J., and Cleveland,J.L. (2007). Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. *Blood* 110, 313-322.
- Caro,L.H., Plomp,P.J., Wolvetang,E.J., Kerkhof,C., and Meijer,A.J. (1988). 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *Eur. J. Biochem.* 175, 325-329.
- Carpten,J.D., Faber,A.L., Horn,C., Donoho,G.P., Briggs,S.L., Robbins,C.M., Hostetter,G., Boguslawski,S., Moses,T.Y., Savage,S., Uhlik,M., Lin,A., Du,J., Qian,Y.W., Zeckner,D.J., Tucker-Kellogg,G., Touchman,J., Patel,K., Mousses,S., Bittner,M., Schevitz,R., Lai,M.H., Blanchard,K.L., and Thomas,J.E. (2007). A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448, 439-444.
- Carr,B.I., Cavallini,A., Lippolis,C., D'Alessandro,R., Messa,C., Refolo,M.G., and Tafaro,A. (2013). Fluoro-Sorafenib (Regorafenib) effects on hepatoma cells: growth inhibition, quiescence, and recovery. *J. Cell Physiol* 228, 292-297.
- Castellano,E. and Downward,J. (2010). Role of RAS in the regulation of PI 3-kinase. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 346, 143-169.
- Catalanotti,F., Solit,D.B., Pulitzer,M.P., Berger,M.F., Scott,S.N., Iyriboz,T., Lacouture,M.E., Panageas,K.S., Wolchok,J.D., Carvajal,R.D., Schwartz,G.K., Rosen,N., and Chapman,P.B. (2013). Phase II trial of MEK inhibitor selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with BRAFV600E/K-mutated melanoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 2257-2264.
- Chaisuparat,R., Rojanawatsirivej,S., and Yodsanga,S. (2013). Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Pathol. Oncol. Res.* 19, 189-193.
- Chan,T.O., Rittenhouse,S.E., and Tsichlis,P.N. (1999). AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965-1014.



- Chen,N. and Karantza-Wadsworth,V. (2009). Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim. Biophys. Acta 1793*, 1516-1523.
- Cheng,J.Q., Ruggeri,B., Klein,W.M., Sonoda,G., Altomare,D.A., Watson,D.K., and Testa,J.R. (1996). Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 93*, 3636-3641.
- Cheng,L. and Lai,M.D. (2003). Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J. Gastroenterol. 9*, 2642-2649.
- Chung,K.Y., Shia,J., Kemeny,N.E., Shah,M., Schwartz,G.K., Tse,A., Hamilton,A., Pan,D., Schrag,D., Schwartz,L., Klimstra,D.S., Fridman,D., Kelsen,D.P., and Saltz,L.B. (2005). Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol. 23*, 1803-1810.
- Coppola,D., Khalil,F., Eschrich,S.A., Boulware,D., Yeatman,T., and Wang,H.G. (2008). Down-regulation of Bax-interacting factor-1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer 113*, 2665-2670.
- Cunningham,D., Atkin,W., Lenz,H.J., Lynch,H.T., Minsky,B., Nordlinger,B., and Starling,N. (2010). Colorectal cancer. *Lancet 375*, 1030-1047.
- Cunningham,D., Humblet,Y., Siena,S., Khayat,D., Bleiberg,H., Santoro,A., Bets,D., Mueser,M., Harstrick,A., Verslype,C., Chau,I., and Van,C.E. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med. 351*, 337-345.
- Danial,N.N. and Korsmeyer,S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell 116*, 205-219.
- Davies,B.R., Logie,A., McKay,J.S., Martin,P., Steele,S., Jenkins,R., Cockerill,M., Carlidge,S., and Smith,P.D. (2007). AZD6244 (ARRY-142886), a potent inhibitor of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 kinases: mechanism of action in vivo, pharmacokinetic/pharmacodynamic relationship, and potential for combination in preclinical models. *Mol. Cancer Ther. 6*, 2209-2219.
- de,G.A., de,G.A., Chibaudel,B., Bachet,J.B., Larsen,A.K., Tournigand,C., Louvet,C., and Andre,T. (2011). From chemotherapy to targeted therapy in adjuvant treatment for stage III colon cancer. *Semin. Oncol. 38*, 521-532.
- Debarros,M. and Steele,S.R. (2013). Colorectal cancer screening in an equal access healthcare system. *J. Cancer 4*, 270-280.
- Decanini-Teran,C.O., Gonzalez-Acosta,J., Obregon-Mendez,J., and Vega-de,J.M. (2011). [Rectal cancer: diagnosis, screening and treatment]. *Cir. Cir. 79*, 481-487.
- Degenhardt,K., Mathew,R., Beaudoin,B., Bray,K., Anderson,D., Chen,G., Mukherjee,C., Shi,Y., Gelinas,C., Fan,Y., Nelson,D.A., Jin,S., and White,E. (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell 10*, 51-64.
- Denley,A., Gymnopoulos,M., Kang,S., Mitchell,C., and Vogt,P.K. (2009). Requirement of phosphatidylinositol(3,4,5)trisphosphate in phosphatidylinositol 3-kinase-induced oncogenic transformation. *Mol. Cancer Res. 7*, 1132-1138.
- Dhillon,A.S., Meikle,S., Yazici,Z., Eulitz,M., and Kolch,W. (2002). Regulation of Raf-1 activation and signalling by dephosphorylation. *EMBO J. 21*, 64-71.
- Di,L.M., Travaglio,E., and Altomare,D.F. (2013). New strategies for colorectal cancer screening. *World J. Gastroenterol. 19*, 1855-1860.

- Diao,C., Cheng,R.C., Zhang,J.M., Wei,X.P., Su,Y.J., Liu,Q.Y., and Xu,J.B. (2008). [Clinical observation of XELOX (Capecitabine puls Oxaliplatin): an adjuvant chemotherapy regimen used in stage III colorectal cancer]. *Zhonghua Zhong. Liu Za Zhi.* 30, 147-150.
- Domin,J. and Waterfield,M.D. (1997). Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410, 91-95.
- Downward,J. (2003a). Role of receptor tyrosine kinases in G-protein-coupled receptor regulation of Ras: transactivation or parallel pathways? *Biochem. J.* 376, e9-10.
- Downward,J. (2003b). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11-22.
- Edge,S.B. and Compton,C.C. (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1471-1474.
- Engelman,J.A., Chen,L., Tan,X., Crosby,K., Guimaraes,A.R., Upadhyay,R., Maira,M., McNamara,K., Perera,S.A., Song,Y., Chirieac,L.R., Kaur,R., Lightbown,A., Simendinger,J., Li,T., Padera,R.F., Garcia-Echeverria,C., Weissleder,R., Mahmood,U., Cantley,L.C., and Wong,K.K. (2008). Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers. *Nat. Med.* 14, 1351-1356.
- Engelman,J.A., Luo,J., and Cantley,L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606-619.
- Esparis-Ogando,A., Ocana,A., Rodriguez-Barrueco,R., Ferreira,L., Borges,J., and Pandiella,A. (2008). Synergic antitumoral effect of an IGF-IR inhibitor and trastuzumab on HER2-overexpressing breast cancer cells. *Ann. Oncol.* 19, 1860-1869.
- Eum,K.H., Ahn,S.K., Kang,H., and Lee,M. (2013). Differential inhibitory effects of two Raf-targeting drugs, sorafenib and PLX4720, on the growth of multidrug-resistant cells. *Mol. Cell Biochem.* 372, 65-74.
- Fabian,J.R., Daar,I.O., and Morrison,D.K. (1993). Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol. Cell Biol.* 13, 7170-7179.
- Falasca,M. and Maffucci,T. (2007). Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 211-214.
- Fearon,E.R. and Vogelstein,B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Ferlay,J., Parkin,D.M., and Steliarova-Foucher,E. (2010a). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer* 46, 765-781.
- Ferlay,J., Shin,H.R., Bray,F., Forman,D., Mathers,C., and Parkin,D.M. (2010b). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int. J. Cancer* 127, 2893-2917.
- Fimia,G.M., Stoykova,A., Romagnoli,A., Giunta,L., Di,B.S., Nardacci,R., Corazzari,M., Fuoco,C., Ucar,A., Schwartz,P., Gruss,P., Piacentini,M., Chowdhury,K., and Cecconi,F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447, 1121-1125.
- Flotow,H. and Thomas,G. (1992). Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 267, 3074-3078.
- Foukas,L.C., Claret,M., Pearce,W., Okkenhaug,K., Meek,S., Peskett,E., Sancho,S., Smith,A.J., Withers,D.J., and Vanhaesebroeck,B. (2006). Critical role for the p110alpha phosphoinositide-3-OH kinase in growth and metabolic regulation. *Nature* 441, 366-370.

- Fransen,K., Klintenas,M., Osterstrom,A., Dimberg,J., Monstein,H.J., and Soderkvist,P. (2004). Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 25, 527-533.
- Frisch,S.M. and Francis,H. (1994). Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 124, 619-626.
- Fujita,N., Hayashi-Nishino,M., Fukumoto,H., Omori,H., Yamamoto,A., Noda,T., and Yoshimori,T. (2008a). An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Mol. Biol. Cell* 19, 4651-4659.
- Fujita,N., Itoh,T., Omori,H., Fukuda,M., Noda,T., and Yoshimori,T. (2008b). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol. Biol. Cell* 19, 2092-2100.
- Fung,C., Lock,R., Gao,S., Salas,E., and Debnath,J. (2008). Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol. Biol. Cell* 19, 797-806.
- Gammon,A., Jasperson,K., Kohlmann,W., and Burt,R.W. (2009). Hamartomatous polyposis syndromes. *Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 23, 219-231.
- Giacinti,C. and Giordano,A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene* 25, 5220-5227.
- Goss,K.H. and Groden,J. (2000). Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J. Clin. Oncol.* 18, 1967-1979.
- Grady,W.M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 23, 11-27.
- Gray,R., Barnwell,J., McConkey,C., Hills,R.K., Williams,N.S., and Kerr,D.J. (2007). Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet* 370, 2020-2029.
- Gressner,A.M. and Wool,I.G. (1974). The phosphorylation of liver ribosomal proteins in vivo. Evidence that only a single small subunit protein (S6) is phosphorylated. *J. Biol. Chem.* 249, 6917-6925.
- Grothey,A., Van,C.E., Sobrero,A., Siena,S., Falcone,A., Ychou,M., Humblet,Y., Bouche,O., Mineur,L., Barone,C., Adenis,A., Tabernero,J., Yoshino,T., Lenz,H.J., Goldberg,R.M., Sargent,D.J., Cihon,F., Cupit,L., Wagner,A., and Laurent,D. (2013). Regorafenib monotherapy for previously treated metastatic colorectal cancer (CORRECT): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 381, 303-312.
- Gyapay,G., Morissette,J., Vignal,A., Dib,C., Fizames,C., Millasseau,P., Marc,S., Bernardi,G., Lathrop,M., and Weissenbach,J. (1994). The 1993-94 Genethon human genetic linkage map. *Nat. Genet.* 7, 246-339.
- Gymnopoulos,M., Elsliger,M.A., and Vogt,P.K. (2007). Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 5569-5574.
- Hagner,P.R., Mazan-Mamczarz,K., Dai,B., Balzer,E.M., Corl,S., Martin,S.S., Zhao,X.F., and Gartenhaus,R.B. (2011). Ribosomal protein S6 is highly expressed in non-Hodgkin lymphoma and associates with mRNA containing a 5' terminal oligopyrimidine tract. *Oncogene* 30, 1531-1541.
- Haller,D.G., Catalano,P.J., Macdonald,J.S., O'Rourke,M.A., Frontiera,M.S., Jackson,D.V., and Mayer,R.J. (2005). Phase III study of fluorouracil, leucovorin, and levamisole in high-risk stage II and III colon cancer: final report of Intergroup 0089. *J. Clin. Oncol.* 23, 8671-8678.

- Hanada,T., Noda,N.N., Satomi,Y., Ichimura,Y., Fujioka,Y., Takao,T., Inagaki,F., and Ohsumi,Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 37298-37302.
- Hardcastle,J.D., Chamberlain,J.O., Robinson,M.H., Moss,S.M., Amar,S.S., Balfour,T.W., James,P.D., and Mangham,C.M. (1996). Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* *348*, 1472-1477.
- Harrington,L.S., Findlay,G.M., Gray,A., Tolkacheva,T., Wigfield,S., Rebholz,H., Barnett,J., Leslie,N.R., Cheng,S., Shepherd,P.R., Gout,I., Downes,C.P., and Lamb,R.F. (2004). The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J. Cell Biol.* *166*, 213-223.
- Hewitson,P., Glasziou,P., Watson,E., Towler,B., and Irwig,L. (2008). Cochrane systematic review of colorectal cancer screening using the fecal occult blood test (hemocult): an update. *Am. J. Gastroenterol.* *103*, 1541-1549.
- Hoeflich,K.P., O'Brien,C., Boyd,Z., Cavet,G., Guerrero,S., Jung,K., Januario,T., Savage,H., Punnoose,E., Truong,T., Zhou,W., Berry,L., Murray,L., Amler,L., Belvin,M., Friedman,L.S., and Lackner,M.R. (2009). In vivo antitumor activity of MEK and phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors in basal-like breast cancer models. *Clin. Cancer Res.* *15*, 4649-4664.
- Hornstein,E., Tang,H., and Meyuhas,O. (2001). Mitogenic and nutritional signals are transduced into translational efficiency of TOP mRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *66*, 477-484.
- Hoshino,R., Chatani,Y., Yamori,T., Tsuruo,T., Oka,H., Yoshida,O., Shimada,Y., Ari-i S, Wada,H., Fujimoto,J., and Kohno,M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene* *18*, 813-822.
- Hoy,S.M. and Wagstaff,A.J. (2006). Panitumumab: in the treatment of metastatic colorectal cancer. *Drugs* *66*, 2005-2014.
- Huang,J. and Manning,B.D. (2009). A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *37*, 217-222.
- Huang,J., Wu,S., Wu,C.L., and Manning,B.D. (2009). Signaling events downstream of mammalian target of rapamycin complex 2 are attenuated in cells and tumors deficient for the tuberous sclerosis complex tumor suppressors. *Cancer Res.* *69*, 6107-6114.
- Ichimura,Y., Kirisako,T., Takao,T., Satomi,Y., Shimonishi,Y., Ishihara,N., Mizushima,N., Tanida,I., Kominami,E., Ohsumi,M., Noda,T., and Ohsumi,Y. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488-492.
- Ikenoue,T., Kanai,F., Hikiba,Y., Obata,T., Tanaka,Y., Imamura,J., Ohta,M., Jazag,A., Guleng,B., Tateishi,K., Asaoka,Y., Matsumura,M., Kawabe,T., and Omata,M. (2005). Functional analysis of PIK3CA gene mutations in human colorectal cancer. *Cancer Res.* *65*, 4562-4567.
- Ionov,Y., Nowak,N., Perucho,M., Markowitz,S., and Cowell,J.K. (2004). Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* *23*, 639-645.
- Issa,J.P. (2008). Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res.* *14*, 5939-5940.
- Izquierdo,G., Trujillo,A., and Soriano,C. (1993). [Colon cancer: the efficacy of double-contrast radiography]. *Rev. Gastroenterol. Peru* *13*, 139-147.

- Jaspersen, K.W., Tuohy, T.M., Neklason, D.W., and Burt, R.W. (2010). Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2044-2058.
- Jefferies, H.B., Reinhard, C., Kozma, S.C., and Thomas, G. (1994). Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4441-4445.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 61, 69-90.
- Johnson, S.M., Gulhati, P., Rampy, B.A., Han, Y., Rychahou, P.G., Doan, H.Q., Weiss, H.L., and Evers, B.M. (2010). Novel expression patterns of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway components in colorectal cancer. *J. Am. Coll. Surg.* 210, 767-768.
- Jones, S., Chen, W.D., Parmigiani, G., Diehl, F., Beerewinkel, N., Antal, T., Traulsen, A., Nowak, M.A., Siegel, C., Velculescu, V.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Willis, J., and Markowitz, S.D. (2008). Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 4283-4288.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728.
- Kajitani, T., Takahashi, T., Furushima, K., Takahashi, T., Tamura, S., and Ohta, H. (1981). [Staging of colorectal neoplasms--comparison with Dukes and Astler-Coller classifications]. *Nihon Rinsho* 39, 2132-2136.
- Kenific, C.M., Thorburn, A., and Debnath, J. (2010). Autophagy and metastasis: another double-edged sword. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 241-245.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Khalaileh, A., Dreazen, A., Khatib, A., Apel, R., Swisa, A., Kidess-Bassir, N., Maitra, A., Meyuhas, O., Dor, Y., and Zamir, G. (2013). Phosphorylation of ribosomal protein S6 attenuates DNA damage and tumor suppression during development of pancreatic cancer. *Cancer Res.* 73, 1811-1820.
- Khalid, U., Saleem, T., Imam, A.M., and Khan, M.R. (2011). Pathogenesis, diagnosis and management of primary melanoma of the colon. *World J. Surg. Oncol.* 9, 14.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep.* 2, 330-335.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163-175.
- Kim, M.S., Jeong, E.G., Ahn, C.H., Kim, S.S., Lee, S.H., and Yoo, N.J. (2008). Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum. Pathol.* 39, 1059-1063.
- Kimura, T., Takabatake, Y., Takahashi, A., and Isaka, Y. (2013). Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* 73, 3-7.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761, 763.



- Kirisako,T., Ichimura,Y., Okada,H., Kabeya,Y., Mizushima,N., Yoshimori,T., Ohsumi,M., Takao,T., Noda,T., and Ohsumi,Y. (2000). The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* *151*, 263-276.
- Kirkin,V., McEwan,D.G., Novak,I., and Dikic,I. (2009). A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* *34*, 259-269.
- Kirkwood,J.M., Bastholt,L., Robert,C., Sosman,J., Larkin,J., Hersey,P., Middleton,M., Cantarini,M., Zazulina,V., Kemsley,K., and Dummer,R. (2012). Phase II, open-label, randomized trial of the MEK1/2 inhibitor selumetinib as monotherapy versus temozolomide in patients with advanced melanoma. *Clin. Cancer Res.* *18*, 555-567.
- Klionsky,D.J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 931-937.
- Knight,Z.A. and Shokat,K.M. (2007). Chemically targeting the PI3K family. *Biochem. Soc. Trans.* *35*, 245-249.
- Kohne,C.H. and Peters,G.J. (2000). UFT: mechanism of drug action. *Oncology (Williston. Park)* *14*, 13-18.
- Komatsu,M., Waguri,S., Koike,M., Sou,Y.S., Ueno,T., Hara,T., Mizushima,N., Iwata,J., Ezaki,J., Murata,S., Hamazaki,J., Nishito,Y., Iemura,S., Natsume,T., Yanagawa,T., Uwayama,J., Warabi,E., Yoshida,H., Ishii,T., Kobayashi,A., Yamamoto,M., Yue,Z., Uchiyama,Y., Kominami,E., and Tanaka,K. (2007). Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* *131*, 1149-1163.
- Kong,D. and Yamori,T. (2008). Phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors: promising drug candidates for cancer therapy. *Cancer Sci.* *99*, 1734-1740.
- Kosugi,C., Saito,N., Murakami,K., Ochiai,A., Koda,K., Ono,M., Sugito,M., Ito,M., Oda,K., Seike,K., and Miyazaki,M. (2008). Positron emission tomography for preoperative staging in patients with locally advanced or metastatic colorectal adenocarcinoma in lymph node metastasis. *Hepatogastroenterology* *55*, 398-402.
- Kovacina,K.S., Park,G.Y., Bae,S.S., Guzzetta,A.W., Schaefer,E., Birnbaum,M.J., and Roth,R.A. (2003). Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J. Biol. Chem.* *278*, 10189-10194.
- Kroemer,G., Galluzzi,L., Vandenabeele,P., Abrams,J., Alnemri,E.S., Baehrecke,E.H., Blagosklonny,M.V., El-Deiry,W.S., Golstein,P., Green,D.R., Hengartner,M., Knight,R.A., Kumar,S., Lipton,S.A., Malorni,W., Nunez,G., Peter,M.E., Tschopp,J., Yuan,J., Piacentini,M., Zhivotovsky,B., and Melino,G. (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death. Differ.* *16*, 3-11.
- Kronborg,O., Fenger,C., Olsen,J., Jorgensen,O.D., and Sondergaard,O. (1996). Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* *348*, 1467-1471.
- Ku,B., Woo,J.S., Liang,C., Lee,K.H., Jung,J.U., and Oh,B.H. (2008). An insight into the mechanistic role of Beclin 1 and its inhibition by prosurvival Bcl-2 family proteins. *Autophagy.* *4*, 519-520.
- Labianca,R., Nordlinger,B., Beretta,G.D., Brouquet,A., and Cervantes,A. (2010). Primary colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, adjuvant treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* *21 Suppl 5*, v70-v77.

- Lamark,T., Kirkin,V., Dikic,I., and Johansen,T. (2009). NBR1 and p62 as cargo receptors for selective autophagy of ubiquitinated targets. *Cell Cycle* 8, 1986-1990.
- Lamba,G., Gupta,R., Lee,B., Ambrale,S., and Liu,D. (2012). Current management and prognostic features for gastrointestinal stromal tumor (GIST). *Exp. Hematol. Oncol.* 1, 14.
- Leboeuf,R., Baumgartner,J.E., Benezra,M., Malaguarnera,R., Solit,D., Pratilas,C.A., Rosen,N., Knauf,J.A., and Fagin,J.A. (2008). BRAFV600E mutation is associated with preferential sensitivity to mitogen-activated protein kinase kinase inhibition in thyroid cancer cell lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 93, 2194-2201.
- Lee,J.W., Jeong,E.G., Soung,Y.H., Nam,S.W., Lee,J.Y., Yoo,N.J., and Lee,S.H. (2006). Decreased expression of tumour suppressor Bax-interacting factor-1 (Bif-1), a Bax activator, in gastric carcinomas. *Pathology* 38, 312-315.
- Lefloch,R., Pouyssegur,J., and Lenormand,P. (2009). Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell Cycle* 8, 705-711.
- Leslie,A., Carey,F.A., Pratt,N.R., and Steele,R.J. (2002). The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* 89, 845-860.
- Leung,E., Kim,J.E., Rewcastle,G.W., Finlay,G.J., and Baguley,B.C. (2011). Comparison of the effects of the PI3K/mTOR inhibitors NVP-BEZ235 and GSK2126458 on tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Biol. Ther.* 11, 938-946.
- Li,J., Hou,N., Faried,A., Tsutsumi,S., and Kuwano,H. (2010). Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur. J. Cancer* 46, 1900-1909.
- Li,J., Hou,N., Faried,A., Tsutsumi,S., Takeuchi,T., and Kuwano,H. (2009). Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann. Surg. Oncol.* 16, 761-771.
- Liang,C., Feng,P., Ku,B., Dotan,I., Canaani,D., Oh,B.H., and Jung,J.U. (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* 8, 688-699.
- Liang,X.H., Jackson,S., Seaman,M., Brown,K., Kempkes,B., Hibshoosh,H., and Levine,B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Lievre,A., Rouleau,E., Buecher,B., and Mitry,E. (2010). [Clinical significance of BRAF mutations in colorectal cancer]. *Bull. Cancer* 97, 1441-1452.
- Lin,H.J., Hsieh,F.C., Song,H., and Lin,J. (2005). Elevated phosphorylation and activation of PDK-1/AKT pathway in human breast cancer. *Br. J. Cancer* 93, 1372-1381.
- Little,A.S., Balmanno,K., Sale,M.J., Newman,S., Dry,J.R., Hampson,M., Edwards,P.A., Smith,P.D., and Cook,S.J. (2011). Amplification of the driving oncogene, KRAS or BRAF, underpins acquired resistance to MEK1/2 inhibitors in colorectal cancer cells. *Sci. Signal.* 4, ra17.
- Low,S., Vougioukas,V.I., Hielscher,T., Schmidt,U., Unterberg,A., and Halatsch,M.E. (2008). Pathogenetic pathways leading to glioblastoma multiforme: association between gene expressions and resistance to erlotinib. *Anticancer Res.* 28, 3729-3732.
- Luo,Z., Tzivion,G., Belshaw,P.J., Vavvas,D., Marshall,M., and Avruch,J. (1996). Oligomerization activates c-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism. *Nature* 383, 181-185.
- Lynch,H.T. and de la Chapelle,A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919-932.

- Lyseng-Williamson, K.A. (2012). Cetuximab: a guide to its use in combination with FOLFIRI in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer in the USA. *Mol. Diagn. Ther.* 16, 317-322.
- Ma, L., Chen, Z., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Pandolfi, P.P. (2005). Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 121, 179-193.
- Maira, S.M., Stauffer, F., Brueggen, J., Furet, P., Schnell, C., Fritsch, C., Brachmann, S., Chene, P., De, P.A., Schoemaker, K., Fabbro, D., Gabriel, D., Simonen, M., Murphy, L., Finan, P., Sellers, W., and Garcia-Echeverria, C. (2008a). Identification and characterization of NVP-BEZ235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity. *Mol. Cancer Ther.* 7, 1851-1863.
- Maira, S.M., Voliva, C., and Garcia-Echeverria, C. (2008b). Class IA phosphatidylinositol 3-kinase: from their biologic implication in human cancers to drug discovery. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 12, 223-238.
- Maiuri, M.C., Le, T.G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J.A., Geneste, O., and Kroemer, G. (2007a). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.* 26, 2527-2539.
- Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007b). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 741-752.
- Majeski, A.E. and Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2435-2444.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., Mason, C.S., and Marshall, C.J. (1997). Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 272, 4378-4383.
- Martelli, A.M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Cappellini, A., Ognibene, A., and McCubrey, J.A. (2010). The emerging role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 991-1002.
- Martin, S.J., Reutelingsperger, C.P., McGahon, A.J., Rader, J.A., van Schie, R.C., LaFace, D.M., and Green, D.R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J. Exp. Med.* 182, 1545-1556.
- Masuda, M., Shimomura, M., Kobayashi, K., Kojima, S., and Nakatsura, T. (2011). Growth inhibition by NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, in hepatocellular carcinoma cell lines. *Oncol. Rep.* 26, 1273-1279.
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von, K.A., and Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer* 2, 232-260.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Abrams, S.L., Chappell, W.H., Russo, S., Ove, R., Milella, M., Tafuri, A., Lunghi, P., Bonati, A., Stivala, F., Nicoletti, F., Libra, M., Martelli, A.M., Montalto, G., and Cervello, M. (2009). Emerging Raf inhibitors. *Expert. Opin. Emerg. Drugs* 14, 633-648.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., Stivala, F., Libra, M., Basecke, J., Evangelisti, C., Martelli, A.M., and Franklin, R.A. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1773, 1263-1284.
- Mehrpour, M., Esclatine, A., Beau, I., and Codogno, P. (2010). Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Res.* 20, 748-762.



- Meier,P. and Vousden,K.H. (2007). Lucifer's labyrinth--ten years of path finding in cell death. *Mol. Cell* 28, 746-754.
- Meng,J., Peng,H., Dai,B., Guo,W., Wang,L., Ji,L., Minna,J.D., Chresta,C.M., Smith,P.D., Fang,B., and Roth,J.A. (2009). High level of AKT activity is associated with resistance to MEK inhibitor AZD6244 (ARRY-142886). *Cancer Biol. Ther.* 8, 2073-2080.
- Meric-Bernstam,F. and Gonzalez-Angulo,A.M. (2009). Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J. Clin. Oncol.* 27, 2278-2287.
- Meyuhas,O. (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* 267, 6321-6330.
- Meyuhas,O. and Dreazen,A. (2009). Ribosomal protein S6 kinase from TOP mRNAs to cell size. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 90, 109-153.
- Mijaljica,D., Prescott,M., and Devenish,R.J. (2011). Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy.* 7, 673-682.
- Mills,A.A. (2005). p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev.* 19, 2091-2099.
- Mizushima,N., Noda,T., Yoshimori,T., Tanaka,Y., Ishii,T., George,M.D., Klionsky,D.J., Ohsumi,M., and Ohsumi,Y. (1998). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395, 395-398.
- Mizushima,N., Yamamoto,A., Hatano,M., Kobayashi,Y., Kabeya,Y., Suzuki,K., Tokuhisa,T., Ohsumi,Y., and Yoshimori,T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-668.
- Moasser,M.M. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* 26, 6469-6487.
- Moertel,C.G., Fleming,T.R., Macdonald,J.S., Haller,D.G., Laurie,J.A., Goodman,P.J., Ungerleider,J.S., Emerson,W.A., Tormey,D.C., Glick,J.H., and . (1990). Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 322, 352-358.
- Moertel,C.G., Fleming,T.R., Macdonald,J.S., Haller,D.G., Laurie,J.A., Tangen,C.M., Ungerleider,J.S., Emerson,W.A., Tormey,D.C., Glick,J.H., and . (1995a). Intergroup study of fluorouracil plus levamisole as adjuvant therapy for stage II/Dukes' B2 colon cancer. *J. Clin. Oncol.* 13, 2936-2943.
- Moertel,C.G., Fleming,T.R., Macdonald,J.S., Haller,D.G., Laurie,J.A., Tangen,C.M., Ungerleider,J.S., Emerson,W.A., Tormey,D.C., Glick,J.H., Veeder,M.H., and Mailliard,J.A. (1995b). Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann. Intern. Med.* 122, 321-326.
- Moriyama,Y. and Nelson,N. (1989). Lysosomal H<sup>+</sup>-translocating ATPase has a similar subunit structure to chromaffin granule H<sup>+</sup>-ATPase complex. *Biochim. Biophys. Acta* 980, 241-247.
- Mosmann,T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
- Nahta,R., Yuan,L.X., Zhang,B., Kobayashi,R., and Esteva,F.J. (2005). Insulin-like growth factor-I receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Res.* 65, 11118-11128.
- Nakatogawa,H., Ichimura,Y., and Ohsumi,Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.

- Nakatogawa,H., Suzuki,K., Kamada,Y., and Ohsumi,Y. (2009). Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 458-467.
- Nezis,I.P., Simonsen,A., Sagona,A.P., Finley,K., Gaumer,S., Contamine,D., Rusten,T.E., Stenmark,H., and Brech,A. (2008). Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain. *J. Cell Biol.* *180*, 1065-1071.
- Nowell,P.C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* *194*, 23-28.
- Obenauer,J.C., Cantley,L.C., and Yaffe,M.B. (2003). Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3635-3641.
- Ohren,J.F., Chen,H., Pavlovsky,A., Whitehead,C., Zhang,E., Kuffa,P., Yan,C., McConnell,P., Spessard,C., Banotai,C., Mueller,W.T., Delaney,A., Omer,C., Sebolt-Leopold,J., Dudley,D.T., Leung,I.K., Flamme,C., Warmus,J., Kaufman,M., Barrett,S., Teclé,H., and Hasemann,C.A. (2004). Structures of human MAP kinase kinase 1 (MEK1) and MEK2 describe novel noncompetitive kinase inhibition. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 1192-1197.
- Oyan,B. (2012). Why do targeted agents not work in the adjuvant setting in colon cancer? *Expert. Rev. Anticancer Ther.* *12*, 1337-1345.
- Pankiv,S., Clausen,T.H., Lamark,T., Brech,A., Bruun,J.A., Outzen,H., Overvatn,A., Bjorkoy,G., and Johansen,T. (2007). p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* *282*, 24131-24145.
- Pao,W. and Girard,N. (2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* *12*, 175-180.
- Papadimitriou,C.A., Papakostas,P., Karina,M., Malettou,L., Dimopoulos,M.A., Pentheroudakis,G., Samantas,E., Bamias,A., Miliaras,D., Basdanis,G., Xiros,N., Klouvas,G., Bafaloukos,D., Kafiri,G., Papaspiroiu,I., Pectasides,D., Karanikiotis,C., Economopoulos,T., Efstratiou,I., Korantzis,I., Pisanidis,N., Makatsoris,T., Matsiakou,F., Aravantinos,G., Kalofonos,H.P., and Fountzilas,G. (2011). A randomized phase III trial of adjuvant chemotherapy with irinotecan, leucovorin and fluorouracil versus leucovorin and fluorouracil for stage II and III colon cancer: a Hellenic Cooperative Oncology Group study. *BMC. Med.* *9*, 10.
- Park,S.W., Kang,M.R., Eom,H.S., Han,J.Y., Ahn,C.H., Kim,S.S., Lee,S.H., and Yoo,N.J. (2010). Somatic mutation of PIK3R1 gene is rare in common human cancers. *Acta Oncol.* *49*, 125-127.
- Pattingre,S., Tassa,A., Qu,X., Garuti,R., Liang,X.H., Mizushima,N., Packer,M., Schneider,M.D., and Levine,B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* *122*, 927-939.
- Pearce,L.R., Alton,G.R., Richter,D.T., Kath,J.C., Lingardo,L., Chapman,J., Hwang,C., and Alessi,D.R. (2010). Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *Biochem. J.* *431*, 245-255.
- Perea,J., Lomas,M., and Hidalgo,M. (2011). Molecular basis of colorectal cancer: towards an individualized management? *Rev. Esp. Enferm. Dig.* *103*, 29-35.
- Perez-Tenorio,G., Karlsson,E., Waltersson,M.A., Olsson,B., Holmlund,B., Nordenskjold,B., Fornander,T., Skoog,L., and Stal,O. (2011). Clinical potential of the mTOR targets S6K1 and S6K2 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* *128*, 713-723.
- Peyssonnaud,C. and Eychene,A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol. Cell* *93*, 53-62.

- Philp,A.J., Campbell,I.G., Leet,C., Vincan,E., Rockman,S.P., Whitehead,R.H., Thomas,R.J., and Phillips,W.A. (2001). The phosphatidylinositol 3'-kinase p85alpha gene is an oncogene in human ovarian and colon tumors. *Cancer Res.* *61*, 7426-7429.
- Poggi,S.H., Madison,J.F., Hwu,W.J., Bayar,S., and Salem,R.R. (2000). Colonic melanoma, primary or regressed primary. *J. Clin. Gastroenterol.* *30*, 441-444.
- Pullen,N. and Thomas,G. (1997). The modular phosphorylation and activation of p70s6k. *FEBS Lett.* *410*, 78-82.
- Punnonen,E.L., Marjomaki,V.S., and Reunanen,H. (1994). 3-Methyladenine inhibits transport from late endosomes to lysosomes in cultured rat and mouse fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.* *65*, 14-25.
- Qu,X., Yu,J., Bhagat,G., Furuya,N., Hibshoosh,H., Troxel,A., Rosen,J., Eskelinen,E.L., Mizushima,N., Ohsumi,Y., Cattoretti,G., and Levine,B. (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest* *112*, 1809-1820.
- Rajagopalan,H. and Lengauer,C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature* *432*, 338-341.
- Reardon,J.T., Vaisman,A., Chaney,S.G., and Sancar,A. (1999). Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res.* *59*, 3968-3971.
- Reddy,G.K. (2005). The addition of bevacizumab to FOLFOX4 prolongs survival in relapsed colorectal cancer: interim data from the ECOG 3200 trial. *Clin. Colorectal Cancer* *4*, 300-301.
- Reinhard,C., Fernandez,A., Lamb,N.J., and Thomas,G. (1994). Nuclear localization of p85s6k: functional requirement for entry into S phase. *EMBO J.* *13*, 1557-1565.
- Reinhard,C., Thomas,G., and Kozma,S.C. (1992). A single gene encodes two isoforms of the p70 S6 kinase: activation upon mitogenic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *89*, 4052-4056.
- Rodriguez-Viciano,P., Warne,P.H., Dhand,R., Vanhaesebroeck,B., Gout,I., Fry,M.J., Waterfield,M.D., and Downward,J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* *370*, 527-532.
- Rollven,E., Holm,T., Glimelius,B., Lorinc,E., and Blomqvist,L. (2013). Potentials of high resolution magnetic resonance imaging versus computed tomography for preoperative local staging of colon cancer. *Acta Radiol.*
- Ropero,S., Menendez,J.A., Vazquez-Martin,A., Montero,S., Cortes-Funes,H., and Colomer,R. (2004). Trastuzumab plus tamoxifen: anti-proliferative and molecular interactions in breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* *86*, 125-137.
- Rustgi,A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* *21*, 2525-2538.
- Ruvinsky,I., Sharon,N., Lerer,T., Cohen,H., Stolovich-Rain,M., Nir,T., Dor,Y., Zisman,P., and Meyuhav,O. (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev.* *19*, 2199-2211.
- Saeki,K., Yuo,A., Okuma,E., Yazaki,Y., Susin,S.A., Kroemer,G., and Takaku,F. (2000). Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death. Differ.* *7*, 1263-1269.

- Saltz, L.B., Meropol, N.J., Loehrer, P.J., Sr., Needle, M.N., Kopit, J., and Mayer, R.J. (2004). Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J. Clin. Oncol.* *22*, 1201-1208.
- Samuels, Y., Diaz, L.A., Jr., Schmidt-Kittler, O., Cummins, J.M., DeLong, L., Cheong, I., Rago, C., Huso, D.L., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2005). Mutant PIK3CA promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* *7*, 561-573.
- Samuels, Y. and Velculescu, V.E. (2004). Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* *3*, 1221-1224.
- Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S.M., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Velculescu, V.E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* *304*, 554.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* *14*, 1296-1302.
- Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M., and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* *307*, 1098-1101.
- Sarker, D. and Workman, P. (2007). Pharmacodynamic biomarkers for molecular cancer therapeutics. *Adv. Cancer Res.* *96*, 213-268.
- Scheithauer, W., McKendrick, J., Begbie, S., Borner, M., Burns, W.I., Burris, H.A., Cassidy, J., Jodrell, D., Koralewski, P., Levine, E.L., Marschner, N., Maroun, J., Garcia-Alfonso, P., Tujakowski, J., Van, H.G., Wong, A., Zaluski, J., and Twelves, C. (2003). Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann. Oncol.* *14*, 1735-1743.
- Schreibman, I.R., Baker, M., Amos, C., and McGarrity, T.J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am. J. Gastroenterol.* *100*, 476-490.
- Sebolt-Leopold, J.S., Dudley, D.T., Herrera, R., Van, B.K., Wiland, A., Gowan, R.C., Tecle, H., Barrett, S.D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W.R., and Saltiel, A.R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nat. Med.* *5*, 810-816.
- Seglen, P.O., Gordon, P.B., Grinde, B., Solheim, A., Kovacs, A.L., and Poli, A. (1981). Inhibitors and pathways of hepatocytic protein degradation. *Acta Biol. Med. Ger* *40*, 1587-1598.
- Shah, O.J., Wang, Z., and Hunter, T. (2004). Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr. Biol.* *14*, 1650-1656.
- Shannon, A.M., Telfer, B.A., Smith, P.D., Babur, M., Logie, A., Wilkinson, R.W., Debray, C., Stratford, I.J., Williams, K.J., and Wedge, S.R. (2009). The mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase 1/2 inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) enhances the radiation responsiveness of lung and colorectal tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.* *15*, 6619-6629.
- Shaw, R.J. and Cantley, L.C. (2006). Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* *441*, 424-430.
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W.L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G.B., and Gray, J.W. (1999). PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat. Genet.* *21*, 99-102.

- Shimizu,S., Takehara,T., Hikita,H., Kodama,T., Tsunematsu,H., Miyagi,T., Hosui,A., Ishida,H., Tatsumi,T., Kanto,T., Hiramatsu,N., Fujita,N., Yoshimori,T., and Hayashi,N. (2012). Inhibition of autophagy potentiates the antitumor effect of the multikinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* *131*, 548-557.
- Shin,S.Y., Hyun,J., Yu,J.R., Lim,Y., and Lee,Y.H. (2011). 5-Methoxyflavanone induces cell cycle arrest at the G2/M phase, apoptosis and autophagy in HCT116 human colon cancer cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* *254*, 288-298.
- Shingu,T., Fujiwara,K., Bogler,O., Akiyama,Y., Moritake,K., Shinojima,N., Tamada,Y., Yokoyama,T., and Kondo,S. (2009a). Inhibition of autophagy at a late stage enhances imatinib-induced cytotoxicity in human malignant glioma cells. *Int. J. Cancer* *124*, 1060-1071.
- Shingu,T., Fujiwara,K., Bogler,O., Akiyama,Y., Moritake,K., Shinojima,N., Tamada,Y., Yokoyama,T., and Kondo,S. (2009b). Stage-specific effect of inhibition of autophagy on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Autophagy*. *5*, 537-539.
- Silvestri,A., Pin,E., Huijbers,A., Pellicani,R., Parasido,E.M., Pierobon,M., Petricoin,E., Liotta,L., and Belluco,C. (2013). Individualized therapy for metastatic colorectal cancer. *J. Intern. Med.* *274*, 1-24.
- Slamon,D.J., Leyland-Jones,B., Shak,S., Fuchs,H., Paton,V., Bajamonde,A., Fleming,T., Eiermann,W., Wolter,J., Pegram,M., Baselga,J., and Norton,L. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N. Engl. J. Med.* *344*, 783-792.
- Smith,G., Carey,F.A., Beattie,J., Wilkie,M.J., Lightfoot,T.J., Coxhead,J., Garner,R.C., Steele,R.J., and Wolf,C.R. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *99*, 9433-9438.
- Solidoro,A., Salazar,F., de la Flor,J., Sanchez,J., and Otero,J. (1981). Endoscopic tissue diagnosis of gastric involvement in the staging of non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer* *48*, 1053-1057.
- Solit,D.B., Garraway,L.A., Pratilas,C.A., Sawai,A., Getz,G., Basso,A., Ye,Q., Lobo,J.M., She,Y., Osman,I., Golub,T.R., Sebolt-Leopold,J., Sellers,W.R., and Rosen,N. (2006). BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature*. 2006. Jan. *439*, 358-362.
- Solomon,V.R. and Lee,H. (2009). Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *Eur. J. Pharmacol.* *625*, 220-233.
- Sou,Y.S., Waguri,S., Iwata,J., Ueno,T., Fujimura,T., Hara,T., Sawada,N., Yamada,A., Mizushima,N., Uchiyama,Y., Kominami,E., Tanaka,K., and Komatsu,M. (2008). The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol. Biol. Cell* *19*, 4762-4775.
- Staal,S.P. (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *84*, 5034-5037.
- Steelman,L.S., Chappell,W.H., Abrams,S.L., Kempf,R.C., Long,J., Laidler,P., Mijatovic,S., Maksimovic-Ivanic,D., Stivala,F., Mazzarino,M.C., Donia,M., Fagone,P., Malaponte,G., Nicoletti,F., Libra,M., Milella,M., Tafuri,A., Bonati,A., Basecke,J., Cocco,L., Evangelisti,C., Martelli,A.M., Montalto,G., Cervello,M., and McCubrey,J.A. (2011). Roles of the Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathways in controlling growth and sensitivity to therapy-implications for cancer and aging. *Aging (Albany. NY)* *3*, 192-222.



- Steelman,L.S., Pohnert,S.C., Shelton,J.G., Franklin,R.A., Bertrand,F.E., and McCubrey,J.A. (2004). JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia* 18, 189-218.
- Stolovich,M., Lerer,T., Bolkier,Y., Cohen,H., and Meyuhas,O. (2005). Lithium can relieve translational repression of TOP mRNAs elicited by various blocks along the cell cycle in a glycogen synthase kinase-3- and S6-kinase-independent manner. *J. Biol. Chem.* 280, 5336-5342.
- Stolovich,M., Tang,H., Hornstein,E., Levy,G., Cohen,R., Bae,S.S., Birnbaum,M.J., and Meyuhas,O. (2002). Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 22, 8101-8113.
- Sun,J.M. and Jung,H.C. (2004). [Gastrointestinal carcinoid tumor]. *Korean J. Gastroenterol.* 44, 59-65.
- Takahashi,Y., Coppola,D., Matsushita,N., Cualing,H.D., Sun,M., Sato,Y., Liang,C., Jung,J.U., Cheng,J.Q., Mule,J.J., Pledger,W.J., and Wang,H.G. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat. Cell Biol.* 9, 1142-1151.
- Takayama,T., Ohi,M., Hayashi,T., Miyanishi,K., Nobuoka,A., Nakajima,T., Satoh,T., Takimoto,R., Kato,J., Sakamaki,S., and Niitsu,Y. (2001). Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121, 599-611.
- Tang,H., Hornstein,E., Stolovich,M., Levy,G., Livingstone,M., Templeton,D., Avruch,J., and Meyuhas,O. (2001). Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell Biol.* 21, 8671-8683.
- Tanida,I. (2011). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxid. Redox. Signal.* 14, 2201-2214.
- Tanida,I., Sou,Y.S., Ezaki,J., Minematsu-Ikeguchi,N., Ueno,T., and Kominami,E. (2004a). HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J. Biol. Chem.* 279, 36268-36276.
- Tanida,I., Ueno,T., and Kominami,E. (2004b). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2503-2518.
- Thomas,G.V. (2006). mTOR and cancer: reason for dancing at the crossroads? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16, 78-84.
- Trotman,L.C. and Pandolfi,P.P. (2003). PTEN and p53: who will get the upper hand? *Cancer Cell* 3, 97-99.
- Twelves,C., Scheithauer,W., McKendrick,J., Seitz,J.F., Van,H.G., Wong,A., Diaz-Rubio,E., Gilberg,F., and Cassidy,J. (2012). Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy. *Ann. Oncol.* 23, 1190-1197.
- Twelves,C., Wong,A., Nowacki,M.P., Abt,M., Burris,H., III, Carrato,A., Cassidy,J., Cervantes,A., Fagerberg,J., Georgoulas,V., Hussein,F., Jodrell,D., Koralewski,P., Kroning,H., Maroun,J., Marschner,N., McKendrick,J., Pawlicki,M., Rosso,R., Schuller,J., Seitz,J.F., Stabuc,B., Tujakowski,J., Van,H.G., Zaluski,J., and Scheithauer,W. (2005). Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N. Engl. J. Med.* 352, 2696-2704.

- Van,C.E., Tabernero,J., Lakomy,R., Prenen,H., Prausova,J., Macarulla,T., Ruff,P., van Hazel,G.A., Moiseyenko,V., Ferry,D., McKendrick,J., Polikoff,J., Tellier,A., Castan,R., and Allegra,C. (2012). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. *J. Clin. Oncol.* *30*, 3499-3506.
- Vanhaesebroeck,B., Leever,S.J., Panayotou,G., and Waterfield,M.D. (1997). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* *22*, 267-272.
- Vanhaesebroeck,B. and Waterfield,M.D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* *253*, 239-254.
- Venesio,T., Balsamo,A., D'Agostino,V.G., and Ranzani,G.N. (2012). MUTYH-associated polyposis (MAP), the syndrome implicating base excision repair in inherited predisposition to colorectal tumors. *Front Oncol.* *2*, 83.
- Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M., and Bos,J.L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* *319*, 525-532.
- Vogt,P.K. and Hart,J.R. (2011). PI3K and STAT3: a new alliance. *Cancer Discov.* *1*, 481-486.
- Vogt,P.K., Hart,J.R., Gymnopoulos,M., Jiang,H., Kang,S., Bader,A.G., Zhao,L., and Denley,A. (2010). Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *347*, 79-104.
- Walker,K.S., Deak,M., Paterson,A., Hudson,K., Cohen,P., and Alessi,D.R. (1998). Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* *331 ( Pt 1)*, 299-308.
- Wang,R.C. and Levine,B. (2011). Calcipotriol induces autophagy in HeLa cells and keratinocytes. *J. Invest Dermatol.* *131*, 990-993.
- Wee,S., Jagani,Z., Xiang,K.X., Loo,A., Dorsch,M., Yao,Y.M., Sellers,W.R., Lengauer,C., and Stegmeier,F. (2009). PI3K pathway activation mediates resistance to MEK inhibitors in KRAS mutant cancers. *Cancer Res.* *69*, 4286-4293.
- Weinstein,I.B. (2002). Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* *297*, 63-64.
- Weinstein,I.B. and Joe,A.K. (2006). Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* *3*, 448-457.
- Werner,G., Hagenmaier,H., Drautz,H., Baumgartner,A., and Zahner,H. (1984). Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* *37*, 110-117.
- Wolmark,N., Fisher,B., Rockette,H., Redmond,C., Wickerham,D.L., Fisher,E.R., Jones,J., Glass,A., Lerner,H., Lawrence,W., and . (1988). Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J. Natl. Cancer Inst.* *80*, 30-36.
- Woodruff,J.M. (1976). Pathology of malignant melanoma - part 1. *Clin. Bull.* *6*, 15-23.
- Wool,I.G. (1996). Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem. Sci.* *21*, 164-165.
- Worthley,D.L. and Leggett,B.A. (2010). Colorectal cancer: molecular features and clinical opportunities. *Clin. Biochem. Rev.* *31*, 31-38.

- Wu,G.J., Sinclair,C.S., Paape,J., Ingle,J.N., Roche,P.C., James,C.D., and Couch,F.J. (2000). 17q23 amplifications in breast cancer involve the PAT1, RAD51C, PS6K, and SIGma1B genes. *Cancer Res.* *60*, 5371-5375.
- Wu,Y.T., Tan,H.L., Shui,G., Bauvy,C., Huang,Q., Wenk,M.R., Ong,C.N., Codogno,P., and Shen,H.M. (2010). Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *285*, 10850-10861.
- Wullschleger,S., Loewith,R., and Hall,M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* *124*, 471-484.
- Wyllie,A.H., Kerr,J.F., and Currie,A.R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* *68*, 251-306.
- Xu,C.X., Zhao,L., Yue,P., Fang,G., Tao,H., Owonikoko,T.K., Ramalingam,S.S., Khuri,F.R., and Sun,S.Y. (2011). Augmentation of NVP-BEZ235's anticancer activity against human lung cancer cells by blockage of autophagy. *Cancer Biol. Ther.* *12*, 549-555.
- Xue,L., Borutaite,V., and Tolkovsky,A.M. (2002). Inhibition of mitochondrial permeability transition and release of cytochrome c by anti-apoptotic nucleoside analogues. *Biochem. Pharmacol.* *64*, 441-449.
- Yamamoto,A., Tagawa,Y., Yoshimori,T., Moriyama,Y., Masaki,R., and Tashiro,Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* *23*, 33-42.
- Yan,J., Roy,S., Apolloni,A., Lane,A., and Hancock,J.F. (1998). Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J. Biol. Chem.* *273*, 24052-24056.
- Yang,Y.P., Liang,Z.Q., Gu,Z.L., and Qin,Z.H. (2005). Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sin.* *26*, 1421-1434.
- Yeh,J.J., Routh,E.D., Rubinas,T., Peacock,J., Martin,T.D., Shen,X.J., Sandler,R.S., Kim,H.J., Keku,T.O., and Der,C.J. (2009). KRAS/BRAF mutation status and ERK1/2 activation as biomarkers for MEK1/2 inhibitor therapy in colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 834-843.
- Yeh,T.C., Marsh,V., Bernat,B.A., Ballard,J., Colwell,H., Evans,R.J., Parry,J., Smith,D., Brandhuber,B.J., Gross,S., Marlow,A., Hurley,B., Lyssikatos,J., Lee,P.A., Winkler,J.D., Koch,K., and Wallace,E. (2007). Biological characterization of ARRY-142886 (AZD6244), a potent, highly selective mitogen-activated protein kinase kinase 1/2 inhibitor. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1576-1583.
- Yen,W.L. and Klionsky,D.J. (2008). How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology.* (Bethesda. ) *23*, 248-262.
- Yeung,K., Seitz,T., Li,S., Janosch,P., McFerran,B., Kaiser,C., Fee,F., Katsanakis,K.D., Rose,D.W., Mischak,H., Sedivy,J.M., and Kolch,W. (1999). Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* *401*, 173-177.
- Yoshimori,T., Yamamoto,A., Moriyama,Y., Futai,M., and Tashiro,Y. (1991). Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, inhibits acidification and protein degradation in lysosomes of cultured cells. *J. Biol. Chem.* *266*, 17707-17712.
- Yu,L., Alva,A., Su,H., Dutt,P., Freundt,E., Welsh,S., Baehrecke,E.H., and Lenardo,M.J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* *304*, 1500-1502.



Yue,Z., Jin,S., Yang,C., Levine,A.J., and Heintz,N. (2003). Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *100*, 15077-15082.

Yuk,J.M., Shin,D.M., Lee,H.M., Yang,C.S., Jin,H.S., Kim,K.K., Lee,Z.W., Lee,S.H., Kim,J.M., and Jo,E.K. (2009). Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host. Microbe* *6*, 231-243.

Zamzami,N., Marchetti,P., Castedo,M., Zanin,C., Vayssiere,J.L., Petit,P.X., and Kroemer,G. (1995). Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo. *J. Exp. Med.* *181*, 1661-1672.

Zauber,A.G., Levin,T.R., Jaffe,C.C., Galen,B.A., Ransohoff,D.F., and Brown,M.L. (2008). Implications of new colorectal cancer screening technologies for primary care practice. *Med. Care* *46*, S138-S146.

Zbar,A.P., Rambarat,C., and Shenoy,R.K. (2007). Routine preoperative abdominal computed tomography in colon cancer: a utility study. *Tech. Coloproctol.* *11*, 105-109.

Zhang,J., Grindley,J.C., Yin,T., Jayasinghe,S., He,X.C., Ross,J.T., Haug,J.S., Rupp,D., Porter-Westpfahl,K.S., Wiedemann,L.M., Wu,H., and Li,L. (2006). PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature* *441*, 518-522.

Zhao,X.F., Zhao,M.Y., Chai,L., Kukuruga,D., Tan,M., and Stass,S.A. (2013). Amplified RPS6KB1 and CDC2 genes are potential biomarkers for aggressive HIV+/EBV+ diffuse large B-cell lymphomas. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* *6*, 148-154.

Zinda,M.J., Johnson,M.A., Paul,J.D., Horn,C., Konicek,B.W., Lu,Z.H., Sandusky,G., Thomas,J.E., Neubauer,B.L., Lai,M.T., and Graff,J.R. (2001). AKT-1, -2, and -3 are expressed in both normal and tumor tissues of the lung, breast, prostate, and colon. *Clin. Cancer Res.* *7*, 2475-2479.

