



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular

COMBINACIÓN DE UNA TERAPIA ENZIMÁTICA CON NANOTECNOLOGÍA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

María Fuentes Baile

Director: **Miguel Saceda Sánchez**

Codirectora: **Cristina Alenda González**

TESIS DOCTORAL

Elche (Alicante), 2021



La presente tesis doctoral se presenta en la modalidad convencional y, como indicio de calidad, se exponen los siguientes artículos publicados, en los que la doctoranda aparece como primera firmante:

Fuentes-Baile M, Bello-Gil D, Pérez-Valenciano E, Sanz JM, García-Morales P, Maestro B, Ventero MP, Alenda C, Barberá VM, Saceda M. CLyTA-DAAO, Free and Immobilized in Magnetic Nanoparticles, induces Cell Death in Human Cancer Cells. *Biomolecules*. **2020**, *10*, 222. doi: 10.3390/biom10020222

Fuentes-Baile M, García-Morales P, Pérez-Valenciano E, Ventero MP, Sanz JM, de Juan Romero C, Barberá VM, Alenda C, Saceda M. Cell Death Mechanisms Induced by CLyTA-DAAO Chimeric Enzyme in Human Tumor Cell Lines. *Int J Mol Sci*. **2020**, *21*, 8522. doi: 10.3390/ijms21228522

Fuentes-Baile M, Pérez-Valenciano E, García Morales P, de Juan Romero C, Bello-Gil D, Barberá VM, Rodríguez-Lescure Á, Sanz JM, Alenda C, Saceda M. CLyTA-DAAO Chimeric Enzyme Bound to Magnetic Nanoparticles. A New Therapeutical Approach for Cancer Patients? *Int J Mol Sci*. **2021**, *22*, 1477. doi: 10.3390/ijms22031477

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2021.

Fdo.: María Fuentes Baile



El Dr. **Miguel Saceda Sánchez**, Investigador de la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO) y profesor asociado del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y la Dra. **Cristina Alenda González**, facultativa especialista en Anatomía Patológica y directora científica del Biobanco en el Hospital General Universitario de Alicante,

CERTIFICAN QUE:

El trabajo de investigación titulado “Combinación de una terapia enzimática con nanotecnología para el tratamiento del cáncer”, cuya autora es **María Fuentes Baile**, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche y se desarrolla en modalidad convencional.

Para que conste a los efectos oportunos, firman el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2021.

El director de la tesis:

La codirectora de la tesis:

Fdo.: Dr. Miguel Saceda Sánchez

Fdo.: Dra. Cristina Alenda González



La Dra. **Asia Fernández Carvajal**, Catedrática en Bioquímica y Biología Molecular y coordinadora del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular del Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE) de la Universidad Miguel Hernández de Elche,

CERTIFICA QUE:

La doctoranda **María Fuentes Baile** ha completado el Programa de formación Doctoral en Biología Molecular y Celular, alcanzando los objetivos establecidos en el mismo. Y que la Tesis Doctoral titulada “Combinación de una terapia enzimática con nanotecnología para el tratamiento del cáncer”, reúne los indicios de calidad exigidos para el campo de evaluación.

Para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Elche (Alicante), a de de 2021.

Fdo.: Dra. Asia Fernández Carvajal

Agradecimientos

No podría empezar este apartado sin dar las gracias a **Miguel**. El proceso de esta tesis no ha sido nada fácil, sobre todo por la falta de fondos, pero nunca te rendiste y al final hemos conseguido sacarla adelante. Gracias por haber confiado en mí, por haberme apoyado y valorado, por no dejar que me rindiera, por tu paciencia con mi infinita cabezonería, por obligarme a celebrar mis logros y avances cuando mi negatividad no me dejaba verlos. Gracias por haber hecho este trabajo posible y por haber convertido a un “mono entrenado” en una persona con capacidad de razonar (aunque en ocasiones te hayas podido arrepentir). Gracias por toda tu labor como director de tesis, pero también por toda tu ayuda a nivel personal y por las veces que has tenido que hacer de psicólogo. Millones de gracias.

Gracias a **Cristina** por haberme dado la oportunidad, por haber confiado en mí y por tu infinita dedicación con cada cosa que te he pedido. También tengo que agradecer a **Pilar** el apoyo, los consejos y el haber estado siempre disponible para ayudarme cada vez que lo he necesitado. Ojalá hubiera podido ponerte también como directora para que tuvieras el reconocimiento que mereces en todo este trabajo. Gracias también a **Jesús Sanz**, tanto por tu colaboración para que nunca faltara DAO como por haberme dado la oportunidad de hacer mis primeras prácticas en tu laboratorio y presentarme a la enzima CLyTA-DAO, con la que finalmente pasaría tantos años.

Debo agradecer tanto a la **Universidad Miguel Hernández** como al **Instituto de Investigación, Desarrollo e Investigación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE)** toda mi formación como Biotecnóloga y gran parte de mi experiencia profesional en investigación.

He de agradecer a todas y cada una de las personas que han ido pasando durante estos años por el laboratorio, porque todos vosotros me habéis ayudado a mejorar como persona e investigadora. En especial, quiero mencionar a **Maripaz** porque, aunque te hayas ido del laboratorio, no voy a olvidar todos los momentos vividos durante los años que estuviste, las tardes de citómetro, las risas, gracias por haber estado siempre

dispuesta a ayudarme en todo y por ser junto a mí la eterna estresada. Jamás me olvidaría de **Eli**, que ha sido la alegría del lab desde el día que llegó. Gracias por entenderme y por no perder nunca la sonrisa con mis malos modos. Gracias por los chismorreos, las risas, los llantos, las demostraciones de fuerza hercúlea y las lecciones de vocabulario hellinero. Los días son un poquito más tristes si no escucho tu “¡No me eches de menos!” antes de salir. Después de todos estos años te has convertido para mí en una amiga y gracias a ti siempre llevaré a Hellín en mi corazón. También quiero agradecer a **Camino** su apoyo y su ayuda en cada cosa que he necesitado independientemente de la cantidad de trabajo que tuviera. Gracias por todos tus consejos y por tus correcciones tanto con los artículos como con la tesis y gracias también por escucharme y recordarme de vez en cuando que, por muy cuesta arriba que yo lo vea, al final todo saldrá bien.

A lo largo de estos años de tesis, los diferentes contratos me han llevado a pasar tiempo tanto en el Hospital de Alicante como en el de Elche y a ambos les debo agradecer el haberme acogido y haberme permitido descubrir nuevos campos de investigación más allá de mi DAO. Del LAI debo destacar a **Araceli**, a **Jessy**, a **Sandra** y a **Ana** por su ayuda y colaboración el tiempo que estuve allí. Gracias también a todo el personal del HGUE, en especial a **Víctor** por todo su apoyo, por hacerme sentir que valgo para esto y por su infinita ayuda. Gracias también a **Salud** por haberme dado la oportunidad aun conociendo mi falta de tiempo por la tesis y por introducirme en el mundo del Alzheimer.

También debo agradecer al grupo de Investigación del Dr. Vicente Micol, en especial a **Almu** y a **Vero**, el haber estado siempre dispuestas a ayudarme con nuevas técnicas y a prestarme cualquier cosa que necesitara. En este sentido, no me puedo olvidar del Dr. **José Martín Nieto** por haberme permitido hacer los ensayos de inmunocitoquímica en su laboratorio y, concretamente, de **Cristina Quereda** por su disposición y amabilidad para ayudarme, aunque implicara quedarse conmigo hasta las tantas para conseguir unas fotos que me convencieran.

Quiero agradecer en general a mis amigos su comprensión y paciencia con mi falta de tiempo estos últimos años. Gracias a **Veri** por no enfadarte conmigo por todas las veces que has venido de visita y no hemos podido vernos por mi culpa, la próxima sabes que invito yo. En especial me gustaría mencionar a **Cristian** e **Irina**, por ser los que más han

estado presentes y han aguantado mi etapa de mayor estrés. Gracias por ayudarme a desconectar y coger los lunes con más fuerza. Gracias por los días de cine, las excursiones, las planificaciones de viajes frustrados y por todas las noches de charlas y risas en la hoguera. También quiero agradecer a **Aly** el diseño de la portada y sus consejos y ayuda con el formato de la tesis.

A **Ricardo**, mi compañero de aventuras, gracias por tu apoyo incondicional, por celebrar cada pequeño logro como si me hubieran dado el Nobel, por comprenderme y aguantarme en mis peores momentos y enseñarme que todo tiene solución. Gracias por obligarme a descansar cada vez que me obsesiono y parece que se vaya a acabar el mundo sino sigo trabajando, porque no se si habría podido terminar de no ser así. Gracias por tener siempre un **SÍ** preparado para cada cosa que se me ocurre sin pensar en nada más.

Y, por último, aunque no por eso menos importante, a mi familia, porque sin ellos yo no estaría aquí. En especial a **mis padres**, por ser mi principal apoyo y por creer siempre en mí. Gracias por aguantar y respetar mis llantos repentinos y mi mal humor en muchas ocasiones sin motivo alguno. Gracias por haberme convertido en quien soy. Por supuesto, gracias también a mi **madrina** y a mi **padrino** por todo el apoyo y por su interés por mi trabajo.

¡MUCHÍSIMAS GRACIAS A TODOS!

La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad.

Julio Verne

A mis padres

Contenido

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS.....	XV
RESUMEN.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
Capítulo 1. Introducción.....	1
1.1. CÁNCER.....	3
1.1.1. Definición y estadísticas.....	3
1.1.2. Cáncer de páncreas.....	5
1.1.2.1. Características y clasificación.....	5
1.1.2.2. Epidemiología.....	10
1.1.2.3. Factores de riesgo.....	12
1.1.2.4. Sintomatología.....	14
1.1.2.5. Tratamiento.....	15
1.1.3. Cáncer colorrectal.....	16
1.1.3.1. Características y clasificación.....	16
1.1.3.2. Epidemiología.....	21
1.1.3.3. Factores de riesgo.....	23
1.1.3.4. Sintomatología.....	25
1.1.3.5. Tratamiento.....	26
1.1.4. Tumores del sistema nervioso central.....	27
1.1.4.1. Características y clasificación.....	27
1.1.4.2. Epidemiología.....	32

1.1.4.3. Factores de riesgo.....	33
1.1.4.4. Sintomatología.....	34
1.1.4.5. Tratamiento	35
1.2. NUEVOS ENFOQUES TERAPÉUTICOS	38
1.2.1. Terapia génica/enzimática suicida	39
1.2.2. Nanomedicina	42
1.3. ESTRÉS OXIDATIVO.....	46
1.4. D-AMINOÁCIDO OXIDASA	49
1.5. MUERTE CELULAR Y CÁNCER.....	53
1.5.1. Apoptosis	54
1.5.2. Necrosis	57
1.5.3. Autofagia	57
1.5.4. Otros tipos de muerte celular regulada	59
1.6. RUTA DE SEÑALIZACIÓN DE LAS MAPKS Y SU RELACIÓN CON EL ESTRÉS OXIDATIVO.....	62
1.7. MECANISMOS DE RESISTENCIA A FÁRMACOS.....	65
Capítulo 2. Objetivos.....	69
Capítulo 3. Materiales y Métodos	73
3.1. CULTIVO CELULAR.....	75
3.1.1. Líneas celulares	75
3.1.1.1. Cáncer de páncreas	75
3.1.1.2. Cáncer colorrectal.....	75
3.1.1.3. Glioblastoma multiforme.....	76
3.1.1.4. Líneas celulares no tumorales.....	77
3.1.2. Condiciones de cultivo.....	77
3.2. REACTIVOS QUÍMICOS Y TRATAMIENTOS UTILIZADOS	78
3.3. AISLAMIENTO DE CLYTA-DAO	79

3.3.1. Transformación bacteriana	79
3.3.2. Cultivo bacteriano	80
3.3.3. Extracción de CLytA-DAO	80
3.3.4. Purificación de CLytA-DAO.....	81
3.3.5. Cuantificación proteica	81
3.4. INMOVILIZACIÓN DE CLYTA-DAO	81
3.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	83
3.6. ESTUDIO DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR.....	83
3.7. DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR.....	84
3.8. ANÁLISIS DEL CICLO CELULAR	85
3.9. CUANTIFICACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO	87
3.10. ANÁLISIS DEL DAÑO EN EL ADN A TRAVÉS DE LA HISTONA H2A.X.....	88
3.11. EVALUACIÓN DE LA INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA	89
3.12. ESTUDIO DEL POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL	90
3.13. ESTUDIO DE LA EXTERNALIZACIÓN DE FOSFATIDILSERINA	91
3.14. TRANSFECCIÓN CON SIRNA.....	92
3.15. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA	94
3.15.1. Extracción de ARN total	95
3.15.1.1 <i>Líneas celulares</i>	95
3.15.1.2 <i>Biopsias de tejido</i>	96
3.15.2. Transcripción reversa	98
3.15.3. q-PCR	98
3.16. ESTUDIOS DE MICROSCOPÍA.....	101
3.16.1. Microscopia de fluorescencia.....	101
3.16.2. Inmunocitoquímica mediante microscopia confocal.	102
3.18. ESTUDIO DEL ESTADO DE FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS.....	103

3.18.1. Lisados celulares y cuantificación de proteínas	103
3.18.2. Ensayo de ELISA.....	104
3.19. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	106
Capítulo 4. Resultados.....	107
4.1. EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE CLYTA-DAO	109
4.1.1. Ensayos dosis-respuesta.....	109
4.1.2. Estudio del mecanismo de inhibición de la proliferación celular inducido por CLytA-DAO.....	112
4.1.3. Efecto antiproliferativo de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas.	118
4.1.4. Inmovilización en otros soportes.	131
4.2. DETERMINAR EL TIPO DE MECANISMO DE MUERTE CELULAR INDUCIDO POR CLYTA-DAO	133
4.2.1. Daño celular inducido por el tratamiento con CLytA-DAO.....	133
4.2.2. Comparación del efecto inducido por el tratamiento con CLytA-DAO con el causado por la adición puntual de H ₂ O ₂	141
4.2.3. Evaluación de diferentes vías de muerte celular mediante inhibidores específicos.....	147
4.2.4. Análisis de la muerte celular apoptótica en las líneas tumorales de glioblastoma.....	150
4.2.5. Estudio de la muerte celular por <i>parthanatos</i> en las líneas tumorales de páncreas y colon.	154
4.2.6. Participación de la ruta de señalización de las MAPKs en el efecto de CLytA-DAO.....	157
4.3. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS LÍNEAS CELULARES RESISTENTES A LA MUERTE INDUCIDA POR CLYTA-DAO.....	160
4.3.1. Efectos a nivel celular del tratamiento con CLytA-DAO	160

4.3.2. Evaluación del mecanismo de resistencia al efecto citotóxico inducido por CLYTA-DAO en Hs766T de carcinoma de páncreas.....	163
4.3.3. Evaluación del mecanismo de resistencia al efecto citotóxico inducido por CLYTA-DAO en HT-29 de cáncer colorrectal.....	170
4.4. ESTUDIO DE LA COMBINACIÓN DE CLYTA-DAO CON OTROS TRATAMIENTOS ANTITUMORALES	174
4.4.1. Combinación con radioterapia.....	174
4.4.2. Combinación con quimioterapia.....	177
4.4.3. Combinación con otros tratamientos antitumorales.....	178
4.5. EVALUACIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA RESISTENCIA A CLYTA-DAO EN BIOPSIAS DE PACIENTES	181
Capítulo 5. Discusión	191
5.1. CLYTA-DAO JUNTO CON D-ALA INDUCE UN EFECTO CITOTÓXICO SOBRE LA MAYORÍA DE LOS MODELOS TUMORALES EVALUADOS.	193
5.2. LA INMOVILIZACIÓN EN NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS AUMENTA LA ESTABILIDAD DE CLYTA-DAO Y EN CONSECUENCIA SU EFECTO CITOTÓXICO.....	198
5.3. EL ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR CLYTA-DAO CAUSA DAÑOS EN EL ADN, MEMBRANA PLASMÁTICA Y EN LA MEMBRANA MITOCONDRIAL.....	202
5.4. CLYTA-DAAO ACTIVA DIFERENTES MECANISMOS DE MUERTE DEPENDIENDO DEL CONTEXTO CELULAR.....	206
5.5. LA RESISTENCIA A LA MUERTE CELULAR INDUCIDA POR CLYTA-DAO/D-ALA ESTÁ RELACIONADA CON MECANISMOS DE DETOXIFICACIÓN Y SUPERVIVENCIA CELULAR.....	211
5.6. CLYTA-DAO PUEDE UTILIZARSE PARA POTENCIAR EL EFECTO DE OTROS TRATAMIENTOS ANTITUMORALES.....	216
5.7. EL TRATAMIENTO CON CLYTA-DAO PODRÍA SER EFECTIVO EN UN AMPLIO NÚMERO DE PACIENTES DE CP, CCR Y GBM.....	220
Capítulo 6. Conclusiones	225
Capítulo 7. Bibliografía	231
Anexo. Artículos científicos relacionados con la tesis doctoral	255

Abreviaturas y acrónimos

5-FU	5-Fluorouracilo.
ABC	Transportadores de membrana dependientes de ATP (del inglés, <i>ATP-binding cassette</i>).
ADEX	Tumor exocrino endocrino con diferenciación aberrante (del inglés, <i>aberrantly differentiated endocrine exocrine</i>).
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario.
ADP	Adenocarcinoma ductal de páncreas.
AIF	Factor inductor de apoptosis (del inglés, <i>apoptosis-inducing factor</i>).
ANOVA	Análisis de la varianza (del inglés, <i>analysis of variance</i>).
ANT	Translocador de nucleótidos de adenina (del inglés, <i>adenine nucleotide translocator</i>).
Apaf-1	Factor 1 activador de la proteasa apoptótica (del inglés, <i>apoptotic protease activating factor-1</i>).
APC	del inglés <i>Adenomatous Polyposis Coli</i> .
Ape1	Endonucleasa 1 apurínica/apirimidínica (del inglés, <i>apurinic/aprimidinic endonuclease-1</i>).
APTES	3-amino-propiltrietoxisilano.
ARN	Ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> .
ATF4/6	Factor activador de la transcripción 4/6 (del inglés, <i>activating transcription factor 4/6</i>).
ATP/ADP	Adenosina trifosfato/difosfato.
BCNU	Carmustina.
BIP	Péptido inhibidor de Bax (del inglés, <i>Bax inhibiting peptides</i>).
BRAF	Gen homólogo del oncogén viral del sarcoma murino B (del inglés, <i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>).

BRCP/ABCG2	Proteína de resistencia del cáncer de mama (del inglés, <i>breast cancer resistance protein</i>).
CA19-9	Antígeno carbohidratado 19-9 (del inglés, <i>carbohydrate antigen 19-9</i>).
CAT	Catalasa.
CC	Carcinoma de colon.
CCR	Cáncer colorrectal.
CEA	Antígeno carcinoembrionario (del inglés, <i>carcinoembryonic antigen</i>).
CEIC	Comité Ético y de Investigación Clínica.
ClytA	Extremo C-terminal de unión a colina de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina.
CP	Cáncer pancreático.
CQ	Cloroquina.
CR	Carcinoma de recto.
CSIC	Centro Superior de Investigaciones Científicas
Ct	<i>Cycle threshold</i> .
DAO (DAAO)	D-aminoácido oxidasa (<i>D-amino acid oxidase</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol.
DAPM	Patrones moleculares asociados a daño (del inglés, <i>damage associated molecular patterns</i>).
DCC	Gen deleciónado en el cáncer colorrectal (del inglés, <i>Deleted in Colorectal Cancer</i>).
DCFH₂-DA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
DDR	Respuesta al daño en el ADN (del inglés, <i>DNA Damage Response</i>).
DEAE	Dietilaminoetanol.
DISC	Complejo de señalización inductor de muerte (del inglés, <i>death inducing signaling complex</i>).
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i> .
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DNasa	Desoxirribonucleasa

EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (del inglés, <i>epidermal growth factor receptor</i>).
EIF2α	Factor 2 α de iniciación eucariótica (del inglés, <i>eukaryotic initiation factor 2α</i>).
EL	Tampón de lisis de eritrocitos (del inglés, <i>erythrocyte lysis buffer</i>).
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (del inglés, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).
EndoG	Endonucleasa G.
ERK	Quinasas reguladas por señales extracelulares (del inglés, <i>extracellular signal-regulated kinases</i>).
FAD	Dinucleótido de flavina-adenina (del inglés, <i>flavin adenine dinucleotide</i>).
FBS	Suero fetal bovino (del inglés, <i>fetal bovine serum</i>).
FC	<i>Fold-Change</i> .
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos (del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>)
Fe-1	Ferrostatina 1.
GAAD	DNasa activada por GrA (del inglés, <i>GrA-activated DNase</i>).
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GBM	Glioblastoma.
GEM	Gemcitabina
GO	Glucosa oxidasa
GPX	Glutación peroxidasa.
GrA	Granzima A.
GRx	Glutación reductasa.
GSH	Glutación
GST	Glutación s-transferasa.
HDAC	Desacetilasas de histonas (del inglés, <i>histone deacetylases</i>).
HGUE	Hospital General Universitario de Elche.
HMG2	Proteína 2 del grupo de alta movilidad (del inglés, <i>high-mobility group protein 2</i>).

IAPs	Proteínas inhibidoras de la apoptosis (del inglés, <i>inhibitor of apoptosis proteins</i>).
IARC	Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (del inglés, <i>International Agency for Research on Cancer</i>).
IC8	Inhibidor de la caspasa 8.
IDH	Isocitrato deshidrogenasa.
IL	Interleucina.
IMIM	Instituto Municipal de Investigaciones Médicas.
INT	Cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio.
IP3R	Receptor inositol-1,4,5-trifostato (del inglés, <i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor</i>).
IPMN	Neoplasia mucinosa papilar intraductal (del inglés, <i>intraductal papillary mucinous neoplasm</i>).
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiofaloctopiranósido.
IRE1α	Enzima 1 α que precisa inositol (del inglés, <i>inositol-requiring enzyme 1α</i>).
JNK	Quinasas c-Jun terminal (del inglés, <i>c-Jun N-terminal kinase</i>).
KDM6A	Desmetilasa 6A específica de lisina (del inglés, <i>lysine-specific demethylase 6A</i>).
KEAP1	Proteína 1 asociada al ECH tipo Kelch (del inglés, <i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>).
K_{M,ap}	Constante de Michaelis-Menten aparente.
KRAS	Gen homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten (del inglés, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>).
KSF	Medio de queratinocitos sin suero (del inglés, <i>keratinocyte serum-free medium</i>).
LAMP-2A	Proteína 2A de membrana asociada a lisosoma (del inglés, <i>lysosomal associated membrane protein 2A</i>).
LB	Medio Luria-Bertani.
LC3II	Proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (del inglés, <i>microtubule-associated protein 1 light chain-3</i>).
LDH	Lactato deshidrogenasa.

MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos (del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i>).
MCDA	Muerte celular dependiente de autofagia.
MCDL	Muerte celular dependiente de lisosomas.
MCI	Muerte celular inmunogénica.
MCN	Neoplasia quística mucinosa (del inglés, <i>mucinous cystic neoplasm</i>).
MCR	Muerte celular regulada.
MDR	Resistencia a múltiples fármacos (del inglés, <i>multidrug resistance</i>).
MGMT	Metilguanina-ADN-metiltransferasa.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad (del inglés, <i>major histocompatibility complex</i>).
MLKL	Del inglés, <i>mixed lineage kinase domain-like pseudokinase</i> .
MODY	Del inglés, <i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i> .
MRP1	Proteína 1 asociada a la resistencia de múltiples fármacos (del inglés, <i>multidrug resistance-associated protein 1</i>).
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio.
NC-1	Necrostatina 1.
NET	Trampas extracelulares de neutrófilos (del inglés, <i>neutrophil extracellular trap</i>).
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés, <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>).
NMPI	Neoplasia mucinosa papilar intraductal.
NPM	Nanopartículas magnéticas.
Nrf2	Factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés, <i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>).
OGG1	Glicosilasa de ADN 8-oxoguanina (del inglés, <i>8-oxoguanine-DNA glycosylase</i>).
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/ <i>World Health Organization</i> .
PAF	Poliposis adenomatosa familiar.

PanIN	Neoplasia intraepitelial pancreática (del inglés, <i>pancreatic intraepithelial neoplasia</i>).
PARP-1	Poli (ADP-Ribosa) polimerasa 1.
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>).
PCV	Procarbazina, lomustina y vincristina.
PEG	Polietilenglicol.
PERK	Quinasa del RE de tipo proteína quinasa activada por ARN (del inglés, <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>).
PGAM5	Miembro 5 de la familia fosfoglicerato mutasa (del inglés, <i>phosphoglycerate mutase family member 5</i>).
PHAP	Proteína asociada a HLA-DR (del inglés, <i>HLA-DR-associated protein</i>) (HLA-DR: <i>Human Leukocyte Antigen – DR isotype</i>).
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa (del inglés, <i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>).
PMM	Potencial de membrana mitocondrial.
PP	Polipéptido pancreático (del inglés, <i>pancreatic polypeptide</i>).
Pro-T	Oncoproteína pro-timosina α
PS	Fosfatidilserina.
PTP	Poros de transición de permeabilidad.
QD	Quantum dots.
q-PCR	Reacción en cadena polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real.
RE	Retículo endoplasmático.
RIP1/3	Proteína quinasa que interactúa con el receptor 1/3 (del inglés, <i>receptor-interacting protein kinase</i>).
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN (del inglés, <i>RNA-induced silencing complex</i>).
RME	Resonancia magnética espectroscópica.
RMI	Resonancia magnética de imagen.
RNasa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno (del inglés, <i>reactive oxygen species</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> .

SD	Desviación estándar (del inglés, <i>standard deviation</i>).
siRNA	ARN pequeño interferente (del inglés, <i>small interferent RNA</i>).
SLC	Transportadores de solutos (del inglés, <i>solute carrier</i>).
Smac	Segundo activador mitocondrial de las caspasas (del inglés, <i>second mitochondria-derived activator of caspases</i>).
SMAD2/4	del inglés, <i>Mothers Against Decapentaplegic homolog 2/4</i> .
SNC	Sistema nervioso central.
SOD	Superóxido dismutasa.
Sp-1	Espautina-1 (del inglés, <i>Spautin-1</i>).
TC	Tomografía computarizada.
TGCA	Atlas del genoma del cáncer (del inglés, <i>The Cancer Genome Atlas</i>).
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta (del inglés, <i>transforming growth factor beta</i>).
TMD	Dominio transmembrana (del inglés, <i>transmembrane domain</i>).
TMZ	Temozolomida.
TNF	Factor de necrosis tumoral (del inglés, <i>tumor necrosis factor</i>).
TP53	Proteína tumoral 53 (del inglés, <i>tumor protein 53</i>).
TPM	Transición de la permeabilidad mitocondrial.
TPM	Transcritos por millón.
TRADD	Proteína con dominio de muerte asociado al TNFR (del inglés, <i>TNFR-associated death domain protein</i>).
TRAF2	Factor 2 asociado al receptor del TNF (del inglés, <i>TNF receptor-associated factor 2</i>).
TSA	Tricostatina A.
UPR	Respuesta a proteínas desplegadas (del inglés, <i>unfolded protein response</i>).
UV	Ultravioleta.
VIP	Péptido intestinal vasoactivo (del inglés, <i>vasoactive intestinal peptide</i>).
XBP-1	del inglés, <i>x-box binding proteín-1</i> .
XO	Xantina oxidasa.

β -ME

β -mercaptoetanol.

Índice de Figuras

Figura 1. Estimación del porcentaje de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) global para ambos sexos en 2018	4
Figura 2. Anatomía del páncreas	6
Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer pancreático estandarizados por edad en 2018.....	11
Figura 4. Anatomía del intestino grueso.....	17
Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal estandarizados por edad en 2018.....	22
Figura 6. Anatomía del SNC.....	28
Figura 7. Clasificación simplificada de los gliomas según la OMS.	31
Figura 8. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer del SNC estandarizados por edad en 2018	33
Figura 9. Algoritmo de tratamientos para gliomas de alto grado.	37
Figura 10. Nuevas estrategias terapéuticas frente al cáncer	39
Figura 11. Esquema de la terapia génica suicida	40
Figura 12. Relación entre los niveles de ROS y la supervivencia de las células tumorales	48
Figura 13. Reacción catalizada por la D-aminoácido oxidasa	50
Figura 14. Principales formas de muerte celular.....	54
Figura 15. Vías de señalización activadoras de la apoptosis	55
Figura 16. Proceso de autofagia.	59
Figura 17. Mecanismo de la muerte celular por necroptosis	60
Figura 18. Representación de la muerte celular <i>parthanatos</i>	61

Figura 19. Representación de la muerte celular por oxeiptosis.....	62
Figura 20. Ruta de transducción de las MAPKs.....	63
Figura 21. Mecanismos de resistencia a fármacos en las células tumorales	66
Figura 22. Estructura de las nanopartículas magnéticas fluidMAG-DEAE	82
Figura 23. Distribución de las células con el ensayo de Contaje y Viabilidad de Muse® .	84
Figura 24. Análisis de la distribución de las células en las fases del ciclo celular observada con el marcaje de yoduro de propidio	86
Figura 25. Transformación de la sonda DCFH2-DA no fluorescente en DCF fluorescente por las ROS intracelulares	87
Figura 26. Reacciones enzimáticas catalizadas en el ensayo de citotoxicidad de la LDH	90
Figura 27. Distribución de las células marcadas con Anexina V y 7-AAD	91
Figura 28. Formación de siRNA y procedimiento para el silenciamiento génico	93
Figura 29. Comparación entre las sondas SYBR y las sondas TaqMan	99
Figura 30. Esquema de un ELISA tipo sándwich	105
Figura 31. Efecto de CLytA-DAO sobre la proliferación celular	110
Figura 32. Efecto antiproliferativo de 2 U/mL de CLytA-DAO con diferentes concentraciones de D-Ala	112
Figura 33. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala sobre el ciclo celular.....	114
Figura 34. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala durante 24, 48 y 72 horas sobre el ciclo celular.....	116
Figura 35. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala sobre la viabilidad celular...	117
Figura 36. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala sobre el ciclo celular de células de origen no tumoral	118
Figura 37. Evaluación de la toxicidad de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre las células IMIM-PC-2	119

Figura 38. Efecto de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre la proliferación celular.....	121
Figura 39. Variación del porcentaje de células muertas tras ser tratadas con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas.....	123
Figura 40. Efecto de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre la proliferación celular tras 24 horas de tratamiento.....	125
Figura 41. Efecto a tiempos cortos del tratamiento con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y D-Ala.....	128
Figura 42. Variación de la muerte celular inducida por CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, tras haber incubado la enzima a 37°C	129
Figura 43. Toxicidad de la colina y su efecto sobre la actividad antiproliferativa de CLytA-DAO.....	131
Figura 44. Muerte celular inducida por CLytA-DAO libre, inmovilizada en nanopartículas de oro y encapsulada en alginato.....	132
Figura 45. Aumento de las ROS tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	134
Figura 46. Aumento de la histona H2A.X activada tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala	136
Figura 47. Marcaje con yoduro de propidio tras 3 y 6 horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	138
Figura 48. Actividad LDH en el medio extracelular tras 6 horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala	139
Figura 49. Estudio del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala	139
Figura 50. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras quelar el calcio	140
Figura 51. Efecto de H ₂ O ₂ sobre la proliferación celular.....	142
Figura 52. Efecto del tratamiento con H ₂ O ₂ sobre el ciclo celular	144

Figura 53. Efecto del tratamiento con H ₂ O ₂ sobre la viabilidad celular	145
Figura 54. Efecto del tratamiento con H ₂ O ₂ durante 48 y 72 horas sobre el ciclo celular de las líneas celulares Hs766T, e IMIM-PC-2.....	146
Figura 55. Aumento de las ROS tras el tratamiento con H ₂ O ₂	147
Figura 56. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	150
Figura 57. Evaluación de la apoptosis a través de la Anexina V y el 7-AAD tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	151
Figura 58. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras inhibir la caspasa 8 y Bax.	152
Figura 59. Localización de AIF tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	153
Figura 60. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras inhibir PARP-1	155
Figura 61. Localización de AIF tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	157
Figura 62. Niveles de fosforilación de ERK, JNK y p38 tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala	158
Figura 63. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras la inhibición de ERK, JNK y P38	159
Figura 64. Aumento de las ROS tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes.....	161
Figura 65. Aumento de la histona H2A.X activada tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes	161
Figura 66. Estudio del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes	162
Figura 67. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras inhibir P38.....	163

Figura 68. Función de NF-κB en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T.....	165
Figura 69. Función de Nrf2 en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T.....	166
Figura 70. Relación entre Nrf2, OGG1 y MRP1.....	167
Figura 71. Función de la catalasa en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T.....	168
Figura 72. Niveles de expresión de XBP-1, antes y después del <i>splicing</i>	170
Figura 73. Función de NF-κB en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en HT-29.	171
Figura 74. Función de Nrf2, OGG1 y catalasa en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en HT-29	172
Figura 75. Función de GPX2 en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en HT-29	173
Figura 76. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala al utilizar un pretratamiento con sorafenib.....	174
Figura 77. Efecto de la combinación del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala junto con radioterapia.....	176
Figura 78. Efecto de la combinación del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala junto con BCNU	178
Figura 79. Efecto de la combinación del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala junto con TSA	179
Figura 80. Efecto de la combinación del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala junto con DPQ	181
Figura 81. Expresión de <i>NFKB1</i> en las muestras extraídas de TGCA	182
Figura 82. Expresión del gen <i>NFE2L2</i> en líneas celulares y biopsias de pacientes	183

Figura 83. Expresión de <i>NFE2L2</i> en las muestras extraídas de TGCA.....	184
Figura 84. Expresión del gen <i>OGG1</i> en líneas celulares y biopsias de pacientes	185
Figura 85. Expresión de <i>OGG1</i> en las muestras extraídas de TGCA	186
Figura 86. Expresión del gen <i>ABCC1</i> en líneas celulares y biopsias de pacientes	187
Figura 87. Expresión de <i>ABCC1</i> en las muestras extraídas de TGCA.	188
Figura 88. Expresión del gen <i>CAT</i> en líneas celulares y biopsias de pacientes	188
Figura 89. Expresión de <i>CAT</i> en las muestras extraídas de TGCA	189
Figura 90. Expresión del gen <i>GPX2</i> en líneas celulares y biopsias de pacientes	190
Figura 91. Expresión de <i>GPX2</i> en las muestras extraídas de TGCA	190
Figura 92. Mecanismo general de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.....	210
Figura 93. Relación entre algunos de los genes involucrados en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO y Hs766T y el estrés en el RE.....	215

Índice de Tablas

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para determinar la fase del cáncer de páncreas.	10
Tabla 2. Sistema de clasificación TNM para determinar la fase del CCR	21
Tabla 3. Líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino.	75
Tabla 4. Líneas celulares de carcinoma colorrectal.	76
Tabla 5. Líneas celulares de glioblastoma.	77
Tabla 6. Líneas celulares y cultivos primarios de origen no tumoral.	77
Tabla 7. Descripción de los reactivos químicos utilizados.	79
Tabla 8. Código de identificación de los ensayos Taqman utilizados para cada gen específico.	100
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular junto con el valor de IC ₅₀ de CLytA-DAO	111
Tabla 10. Valores de IC ₅₀ de la D-Ala utilizando una concentración constante de 2 U/mL de CLytA-DAO	112
Tabla 11. Porcentaje de células en fase SubG ₁ tras el tratamiento con CLytA-DAO	115
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular tras el tratamiento con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, junto con el valor de IC ₅₀ de la enzima inmovilizada.	122
Tabla 13. Comparación de los valores de IC ₅₀ de CLytA-DAO, libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas, tras 24 o 72 horas de tratamiento.	126
Tabla 14. Valores de IC ₅₀ del H ₂ O ₂	143
Tabla 15. Porcentaje de pacientes de CP, CCR y GBM con elevada expresión de los genes <i>NFE2L2</i> , <i>OGG1</i> , <i>ABCC1</i> , <i>CAT</i> y <i>GPX2</i> .	221

Resumen

La terapia enzimática suicida consiste en dirigir una enzima hacia el tumor y, a continuación, administrar de forma sistémica un profármaco inocuo que debe ser sustrato de la enzima y que, al ser procesado por ella, se convertirá en un fármaco anticancerígeno activo. En este trabajo se ha evaluado la eficacia del tratamiento con la enzima D-aminoácido oxidasa (DAO) de *Rhodotorula gracilis* junto con D-alanina frente a líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma. La DAO cataliza la oxidación de D-aminoácidos, convirtiéndolos en alfa-cetoácidos y amonio y generando H_2O_2 , que induce estrés oxidativo. Concretamente, se ha utilizado una quimera que presenta la DAO unida al dominio de unión a colina de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina (CLyTA) de *Streptococcus pneumoniae*, permitiendo la inmovilización de la enzima en soportes que presenten colina o derivados, como el dietilaminoetanol (DEAE).

Los resultados de este estudio demuestran que CLyTA-DAO induce un efecto antiproliferativo en la mayoría de las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma utilizadas. Esta disminución de la proliferación celular se debe a un efecto citotóxico causado por el aumento de especies reactivas de oxígeno en el interior celular, que induce daños en el ADN y en la membrana plasmática, así como la disminución del potencial de membrana mitocondrial. Al analizar el efecto de la enzima en células no tumorales, se observó que no se producía muerte celular o bien ésta era significativamente inferior a la observada en las líneas tumorales. La utilización de la DAO quimérica permitió además su inmovilización en nanopartículas magnéticas funcionalizadas con DEAE, lo que aumentó el efecto del tratamiento al mejorar la estabilidad de la enzima a 37°C. Se estudió también la inmovilización en nanopartículas de oro y cápsulas de alginato, aunque el efecto citotóxico disminuyó considerablemente con respecto al observado con la enzima libre.

Al analizar el mecanismo de muerte celular, se observó que el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala es capaz de activar diferentes tipos de muerte celular, de modo que en las líneas celulares de carcinoma de páncreas y colon se produce una necrosis regulada

mientras que en las de glioblastoma se activa la vía intrínseca de la apoptosis. Entre las diferentes líneas celulares estudiadas hubo dos resistentes al efecto citotóxico inducido por CLytA-DAO, Hs766T de carcinoma de páncreas y HT-29 de carcinoma colorrectal. Al profundizar en el mecanismo de resistencia de ambas líneas celulares, se observó que está relacionado con la sobreexpresión de genes involucrados en mecanismos de detoxificación, en la respuesta frente al estrés oxidativo y en la supervivencia celular. La expresión de estos genes fue estudiada también en biopsias de pacientes de los tres tipos de tumores y, los resultados sugieren que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala podría ser eficaz en un alto porcentaje de pacientes. Se demostró que la enzima CLytA-DAO también podría ser utilizada en combinación con radioterapia, quimioterapia, o con tratamientos epigenéticos o basados en reducir la reparación del ADN para potenciar el efecto sobre los pacientes. En conclusión, los resultados de este trabajo indican que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala muestra un gran potencial como estrategia terapéutica anticancerígena, tanto por sí misma como en combinación con otros tratamientos, en pacientes con cáncer de páncreas, colorrectal y glioblastoma.

Abstract

Suicide enzyme therapy consists of targeting an enzyme to the tumor and then, to administer systemically a harmless prodrug that must be a substrate for the enzyme and that it will become an active anticancer drug after reacting with it. In this work, treatment efficacy with the enzyme D-amino acid oxidase (DAAO) from *Rhodotorula gracilis* together with D-alanine against pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines has been evaluated. DAAO catalyzes D-amino acids' oxidation, converting them into alpha-ketoacids and ammonia and generating H₂O₂, which induces oxidative stress. Specifically, a chimera has been used, which presents DAAO bound to the choline-binding domain of the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (CLyTA) from *Streptococcus pneumoniae*, allowing the enzyme immobilization on supports containing choline or derivatives, such as diethylaminoethanol (DEAE).

The results of this study demonstrate that CLyTA-DAAO induces an antiproliferative effect in most of the pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines used. This decrease in cell proliferation is due to a cytotoxic effect caused by the increase in reactive oxygen species inside the cell, which induces damage to DNA and plasma membrane as well as a decrease in the mitochondrial membrane potential. By analyzing the enzyme effect in non-tumor cells, absence or significantly lower levels of cell death were observed in comparison to tumor cell lines. In addition, the use of a chimeric DAAO allowed its immobilization on DEAE-functionalized magnetic nanoparticles, increasing the effect of the treatment by improving the enzyme stability at 37°C. Immobilization in gold nanoparticles and alginate capsules was also studied, although the cytotoxic effect decreased considerably compared to that observed with the free enzyme.

Analysis of the cell death mechanisms showed that treatment with CLyTA-DAAO and D-Ala triggers different types of cell death. In pancreatic and colorectal carcinoma cell lines a regulated necrosis occurs while in glioblastoma cell lines the intrinsic pathway of apoptosis is activated. Among the different cell lines studied, two of them were resistant

to the cytotoxic effect induced by CLytA-DAAO, Hs766T from pancreatic carcinoma and HT-29 from colorectal carcinoma. By deepening in the mechanism of resistance in both cell lines, it was observed that it is related to the overexpression of genes involved in detoxification mechanisms, response to oxidative stress and cell survival. The expression of these genes was also studied in biopsies from patients with each of the three types of tumors, and the results suggest that treatment with CLytA-DAAO and D-Ala could be effective in a high percentage of these patients. In addition, it was shown that the CLytA-DAAO enzyme could also be used in combination with either radiotherapy, chemotherapy, epigenetic therapy, or therapy based on reducing DNA repair, in order to enhance the effect on patients. In conclusion, the results of this work indicate that treatment with CLytA-DAAO and D-Ala shows a high potential as an anticancer therapeutic strategy, both by itself and in combination with other treatments, in patients with pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma.



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

**Una investigación básica de calidad es fundamental
para un posterior desarrollo, porque de ella saldrán
resultados no previsibles a priori.**

MARGARITA SALAS.

1.1. Cáncer

1.1.1. Definición y estadísticas

Un tumor es un conjunto de células que presenta un crecimiento y una división descontrolados. Normalmente, surge a partir de una mutación o conjunto de mutaciones que causan la proliferación descontrolada de una célula y resulta en la aparición de una población de células tumorales, en la que siguen apareciendo mutaciones, algunas de las cuales proporcionan ventajas selectivas (mayor proliferación, supervivencia, invasión, metástasis, etc.), que las convertirán en dominantes dentro de la población tumoral.

Los tumores se pueden dividir en benignos y malignos. Los tumores benignos permanecen en su localización original y normalmente son extraídos quirúrgicamente. En cambio, los tumores malignos son capaces de invadir tejidos circundantes y de expandirse hacia otras localizaciones del organismo a través de los sistemas circulatorios o linfáticos, generando lo que se conoce como metástasis. La enfermedad del cáncer hace referencia a los tumores malignos y su riesgo radica en su capacidad de metastatizar.

En base al tipo celular que se vea afectado, los tumores se pueden dividir en: carcinoma, que afecta a las células epiteliales; sarcoma, que afecta al tejido conectivo (músculo, hueso, cartílago y tejido fibroso); leucemia o linfoma, que afecta a las células sanguíneas o del sistema inmune, respectivamente; y tumores neuroectodérmicos, que afectan a las células del sistema nervioso central y periférico [1]. Dentro de estos grupos, los carcinomas son los más comunes en humanos (aproximadamente el 90%).

Actualmente, la incidencia y mortalidad del cáncer aumentan rápidamente a nivel mundial. En 2018, se estima que hubo 18,1 millones de casos nuevos y 9,6 millones de muertes producidas por esta enfermedad. Para ambos sexos, el cáncer de pulmón fue el más común (11,6%) y la principal causa de muerte (18,4%), seguido por el cáncer de mama (11,6%) y el cáncer colorrectal (10,3%) en cuanto a incidencia, y por el cáncer colorrectal (9,2%) y el cáncer de estómago (8,2%) en cuanto a mortalidad (**Figura 1**) [2].

Introducción

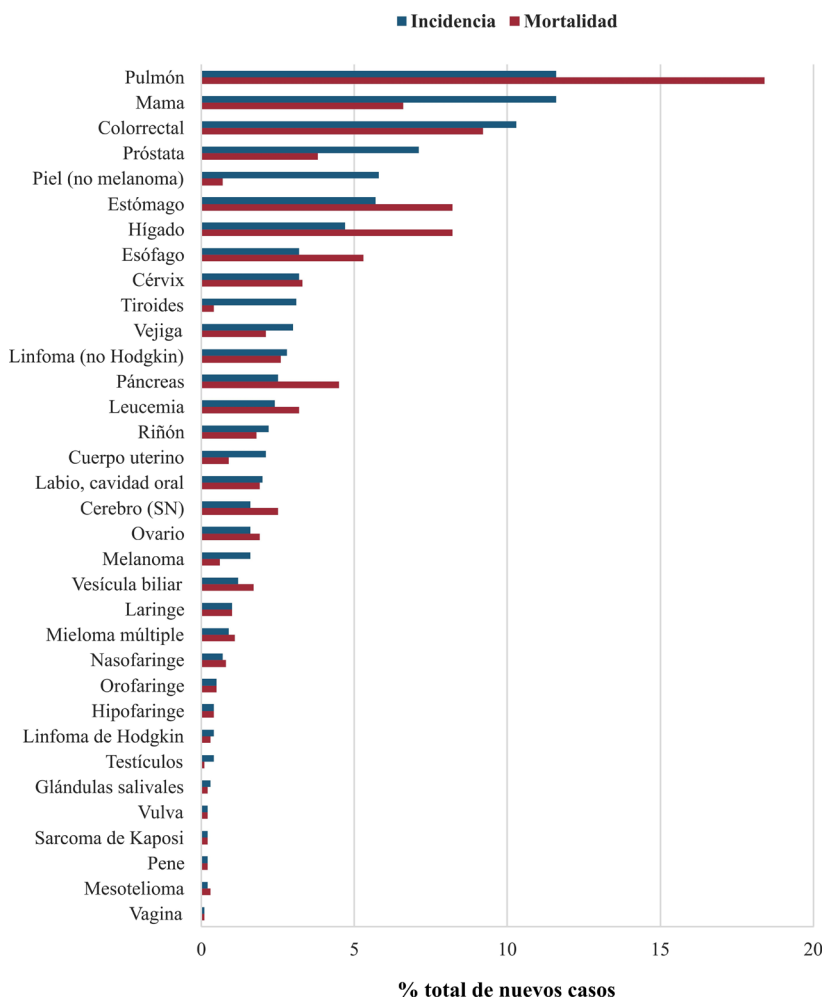


Figura 1. Estimación del porcentaje de incidencia (azul) y mortalidad (rojo) global para ambos sexos en 2018 (fuente: GLOBOCAN, 2018).

En España, se estima que en 2018 hubo alrededor de 270.000 nuevos casos diagnosticados, prevaleciendo el cáncer colorrectal (13,7%), seguido del cáncer de mama (12,1%) y el cáncer de próstata (11,7%). Teniendo en cuenta la mortalidad, el cáncer de pulmón es el que más muertes ocasionó con un 20,2%, seguido del cáncer colorrectal (14,6%) y del cáncer de páncreas (6,4%) [3].

Algunos estudios han revelado que gran parte de los casos diagnosticados podrían haberse evitado reduciendo la exposición a factores de riesgo relacionados con el estilo de vida y el medio ambiente [4–6]. La forma más efectiva de combatir el cáncer sería previniendo el desarrollo de la enfermedad y realizando una detección más temprana.

Algunos tipos de cáncer pueden ser fácilmente curados si se detectan antes de que se produzca la metástasis, mediante tratamientos localizados como la cirugía o la radiación. Realizar estudios genéticos de la población permitiría identificar a aquellos individuos susceptibles de desarrollar cáncer hereditario, facilitando la detección temprana y permitiendo la distinción entre subtipos de cáncer con diferente pronóstico o respuesta al tratamiento. Una vez desarrollada la enfermedad, la mayoría de los fármacos anticancerígenos dañan el ácido desoxirribonucleico (ADN) o bien inhiben la replicación. Como consecuencia, se trata de fármacos tóxicos no sólo para las células tumorales, sino también para las células sanas, limitando su efectividad.

En conclusión, debido a la elevada incidencia y mortalidad del cáncer, es necesario continuar desarrollando métodos para su prevención y detección temprana, así como nuevos tratamientos más efectivos y dirigidos de manera más específica hacia el tumor.

1.1.2. Cáncer de páncreas

1.1.2.1. Características y clasificación

El páncreas es un órgano localizado en el abdomen, entre el estómago y la columna vertebral. Se puede dividir en varias secciones: la cabeza, que es el extremo más ancho, el cuello y el cuerpo, que corresponden a la parte central, y la cola, que forma la zona más estrecha (**Figura 2**).

El páncreas contiene tejido con función exocrina y endocrina. El componente exocrino está formado por conductos rodeados de pequeñas agrupaciones de células llamadas acinos, los cuales liberan enzimas digestivas que dirigen al intestino delgado para ayudar a digerir y descomponer los alimentos. Por su parte, el componente endocrino está formado por células agrupadas llamadas islotes de Langerhans, que secretan hormonas como la insulina, el glucagón, la somatostatina, el polipéptido pancreático (PP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), todas ellas encargadas de la regulación del metabolismo.

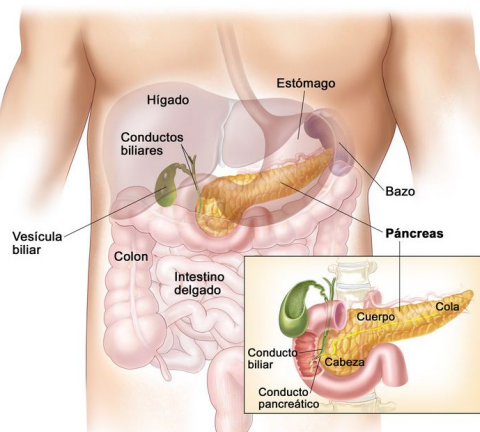


Figura 2. Anatomía del páncreas (fuente: Instituto Nacional del Cáncer, original de Terese Winslow).

El cáncer pancreático (CP) suele desarrollarse a partir de una serie de mutaciones que derivan en la aparición de lesiones precursoras [7]. Los precursores más conocidos son:

- Neoplasia intraepitelial pancreática (PanIN). Consiste en una lesión microscópica no invasiva que tiene lugar en los conductos pancreáticos pequeños (< 0,5 cm). Se ha observado que este tipo de lesiones podrían desempeñar un papel en el desarrollo de pancreatitis y, el daño producido por ésta puede derivar en la aparición del tumor [8]. Existen tres grados de PanIN y se estima que una PanIN de tercer grado tarda entre 11 y 12 años en transformarse en un CP [9].
- Neoplasia mucinosa papilar intraductal (NMPI). Este tipo de lesiones son macroscópicas y pueden aparecer en el conducto pancreático principal o en una de las ramificaciones, siendo las primeras, las lesiones con un mayor porcentaje de malignidad [10].
- Neoplasia quística mucinosa (MCN). Están formadas por células epiteliales productoras de mucina, conforman el 25% de los quistes pancreáticos extraídos y son más comunes en mujeres [7].

El CP se puede dividir en función de: 1) si afecta a células epiteliales (carcinomas) o no epiteliales; 2) según su comportamiento en benignos, premalignos y malignos y; 3) según al componente pancreático que se vea afectado, en exocrinos y endocrinos.

- Tumores exocrinos. Son los tumores pancreáticos más comunes e incluyen los siguientes tipos:
 - El adenocarcinoma ductal, se localiza en los conductos pancreáticos y es el CP más común, abarcando el 85% de todas las neoplasias pancreáticas.
 - El adenocarcinoma acinar, representa el 5% de los casos y se inicia en los acinos, causando normalmente una producción elevada de enzimas digestivas que resultan en erupciones cutáneas y dolor en las articulaciones.
 - La NMPI, suele aparecer en los conductos del páncreas formando un fluido denso conocido como mucina.
 - Existen otros tipos de tumores exocrinos menos comunes como: carcinoma acinar, carcinoma adenoescamoso, carcinoma coloide, tumor de células gigantes, carcinoma hepatoide, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, cistoadenoma seroso, carcinoma de células en anillo de sello, tumores sólidos y pseudopapilares, carcinoma de células escamosas y carcinoma desdiferenciado.
- Tumores endocrinos. También se conocen como tumores pancreáticos neuroendocrinos, son menos comunes que los exocrinos y se dividen en funcionales y no funcionales en base a si son capaces o no de producir hormonas.
 - Los tumores funcionales, se suelen nombrar en función de la hormona que generan en exceso: insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, somatostatina, VIPomas, PPomas.
 - Los tumores no funcionales, son más difíciles de diagnosticar ya que no liberan suficientes hormonas como para causar síntomas. Dentro de los tumores endocrinos son los mayoritarios y se suelen detectar en etapas avanzadas de la enfermedad, una vez ya se ha generado la metástasis.

Normalmente, al hablar de CP nos referimos al adenocarcinoma ductal de páncreas (ADP) por ser el más común. Este tipo de tumor suele localizarse en la cabeza del páncreas, generando una obstrucción en el conducto biliar común, que produce una ictericia indolora. Puesto que la mayoría de los casos no muestran síntomas hasta estadios avanzados de la enfermedad, rara vez se diagnostica de forma temprana, y se presenta como una masa sólida indefinida de color amarillento.

Microscópicamente, el ADP consiste en glándulas tubulares atípicas con patrones de crecimiento heterogéneos entre los distintos tumores y dentro de un mismo tumor. La clasificación histopatológica es un factor pronóstico importante y se realiza de acuerdo con los criterios definidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en función de las estructuras formadas, la morfología celular, la presencia de mucina, el polimorfismo nuclear y el número de mitosis [11].

Se han realizado varias clasificaciones en función de la heterogeneidad molecular. Algunas de estas clasificaciones consideran tres subgrupos (clásico, cuasi-mesenquimal y de tipo endocrino) [12], mientras que otras dividen el ADP en cuatro subgrupos (clásico, basal, estroma normal y estroma activado) [13]. Recientemente, se realizó una clasificación en función de la expresión diferencial de factores de transcripción cruciales y de sus dianas [14]:

- Escamoso. Presenta alteraciones en genes relacionados con inflamación, hipoxia, reprogramación metabólica, señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF β), activación de la ruta MYC, autofagia, mutaciones en la proteína tumoral 53 (TP53) y la desmetilasa 6A específica de lisina (KDM6A) y sobreexpresión del factor de transcripción TP63 y sus genes diana. Este subtipo se considera de mal pronóstico.
- Pancreático progenitor. Contiene altos niveles de factores de transcripción cruciales para la diferenciación de células pancreáticas endodérmicas (PDX1, MNX1, HNF4G, HNF4A, HNF1B, HNF1A, FOXA2, FOXA3 y HES1) y parece estar ligado a errores en las células encargadas del desarrollo pancreático. Concretamente, PDX1 es uno de los principales reguladores transcripcionales en la formación de todos los tipos de células pancreáticas.
- Exocrino endocrino con diferenciación aberrante (ADEX). Tiene altos niveles de factores de transcripción involucrados en las etapas finales del desarrollo pancreático que definen la diferenciación exocrina y endocrina. Se incluyen factores de transcripción como NR5A2, MIST1 y RBPJL y genes relacionados con la diferenciación endocrina y la diabetes tipo MODY (del inglés, *Maturity Onset Diabetes of the Young*).

- Inmunogénico. Implica una infiltración del sistema inmune, en gran parte compuesta por células B y T y la sobreexpresión de *PD-1* y *CTLA-4*. Estos datos sugieren un papel crucial para los agentes inmunomoduladores como agentes terapéuticos.

En clínica, los tumores se suelen agrupar en función de la etapa de desarrollo, tras realizar pruebas de diagnóstico que indiquen la localización y si se ha producido o no una metástasis. Este tipo de clasificación facilita la predicción del pronóstico y ayuda a determinar la estrategia terapéutica óptima para el paciente. Tras el correspondiente examen físico y la analítica de sangre, se realizan pruebas de imagen para conocer la localización y la etapa en la que se encuentra el tumor, pudiendo clasificarse en: resecable, resecable al límite, localmente avanzado y metastático [15].

- Resecable. Puede ser eliminado quirúrgicamente. El tumor se localiza en el páncreas, no está cerca de arterias o venas importantes y no hay evidencias de que el tumor se haya extendido a órganos lejanos del páncreas. Aproximadamente el 10% de los pacientes diagnosticados se encuentran en esta etapa.
- Resecable en el límite. Puede ser difícil o imposible eliminar el tumor por cirugía tras el diagnóstico, pero si previamente se logra disminuir su tamaño mediante quimio o radioterapia, es posible extirparlo después con márgenes negativos, es decir, sin dejar células tumorales detectables. Aproximadamente el 10% de los pacientes se encuentran en esta etapa al diagnóstico.
- Localmente avanzado. Se encuentra en el área que rodea el páncreas y no hay signos de metástasis, pero no puede ser eliminado quirúrgicamente porque ha crecido cercano a arterias, venas u órganos y hay mucho riesgo de dañar estas estructuras. Engloba aproximadamente el 30% de los pacientes diagnosticados.
- Metastático. El tumor se ha extendido a otros órganos, normalmente hacia el hígado, pulmones o zonas distantes del abdomen. Alrededor del 50% de los pacientes se diagnostican en esta etapa.

Una vez realizada la cirugía, se puede establecer la clasificación TNM (Tumor, Nodo, Metástasis), en base a si el tumor primario está localizado (T), se ha expandido a los nódulos linfáticos (N) o si ha alcanzado otros órganos (M). Estos datos se combinan

con la etapa de desarrollo en que se encuentra el tumor, y se divide de 0 a 4 en función del tamaño. La **Tabla 1** muestra en detalle el sistema TNM [16].

T (Tumor localizado)	
Tx	No puede ser evaluado.
T0	No hay evidencias de tumor primario.
Tis	El tumor está localizado.
T1	El tumor está localizado y mide ≤ 2 cm.
T2	El tumor está localizado y mide 2-4 cm.
T3	El tumor se extiende más allá del páncreas, pero no implica arterias ni venas y mide > 4 cm.
T4	El tumor se extiende más allá del páncreas y se encuentra cerca de venas o arterias. No se puede extraer con cirugía.
N (Implica nódulos linfáticos)	
Nx	No puede ser evaluado.
N0	No se han encontrado evidencias de cáncer.
N1	El tumor se ha extendido a 1-3 nódulos linfáticos.
N2	El tumor se ha extendido a ≥ 4 nódulos linfáticos.
M (El tumor se ha extendido a otros órganos)	
M0	La enfermedad no se ha extendido.
M1	El tumor se ha expandido a otros órganos. El cáncer pancreático comúnmente se extiende al hígado, peritoneo y pulmones.
Etapa	
0	El tumor está localizado (Tis, N0, M0).
IA	El tumor está localizado y mide ≤ 2 cm (T1, N0, M0).
IB	El tumor está localizado y mide > 2 cm (T2, N0, M0).
IIA	El tumor se extiende más allá del páncreas, pero no implica arterias ni venas y mide > 4 cm (T3, N0, M0).
IIB	El tumor, de cualquier tamaño, se ha extendido a 1-3 nódulos linfáticos (T1/T2/T3, N1, M0).
IIIA	El tumor, de cualquier tamaño, se ha extendido a ≥ 4 nódulos linfáticos (T1/T2/T3, N2, M0).
IIIB	El tumor se extiende cerca de venas o arterias y puede que se haya extendido a nódulos linfáticos, pero no a otras partes del cuerpo (T4, N0/N1/N2, M0).
IV	El tumor se ha extendido a otros órganos (T1/T2/T3, N1/N2, M1).
Recurrente	El cáncer se ha vuelto a producir tras el tratamiento. Se repetirán las pruebas que se hicieron en el diagnóstico inicial.

Tabla 1. Sistema de clasificación TNM para determinar la fase del cáncer de páncreas.

1.1.2.2. Epidemiología

El CP no presenta una elevada incidencia, está clasificado en la 13ª posición de los tipos de cáncer más comunes a nivel mundial y en 2018 se estima que hubo 458.918 casos (2,5%). Sin embargo, es la séptima causa de muerte por cáncer con una estimación de 432.242 (4,5%) muertes en 2018 [2].

La incidencia varía significativamente entre países, mostrando una tendencia general de mayores tasas de incidencia en los países desarrollados. En concreto,

encontramos la máxima incidencia en Europa, seguido de América del Norte y Oceanía, y la mínima en África y el sur de Asia (**Figura 3**). En cuanto a género, se observa una ligera diferencia siendo más común en hombres (2,6%, 243.033 casos) que en mujeres (2,5%, 215.885 casos) [2]. El CP rara vez se diagnostica antes de los 55 años, y la mayor incidencia se observa en personas mayores de 70 años [17].

La tasa de mortalidad del CP también varía considerablemente entre países. En 2018, la mayor tasa de mortalidad se observó en Europa occidental, seguida por Europa central y oriental, mientras que la menor tasa de mortalidad se observó en países del sur de Asia, seguida de África oriental y occidental (**Figura 3**). La tasa de mortalidad aumenta con la edad y casi el 90% de todas las muertes se producen en personas mayores de 55 años [2].

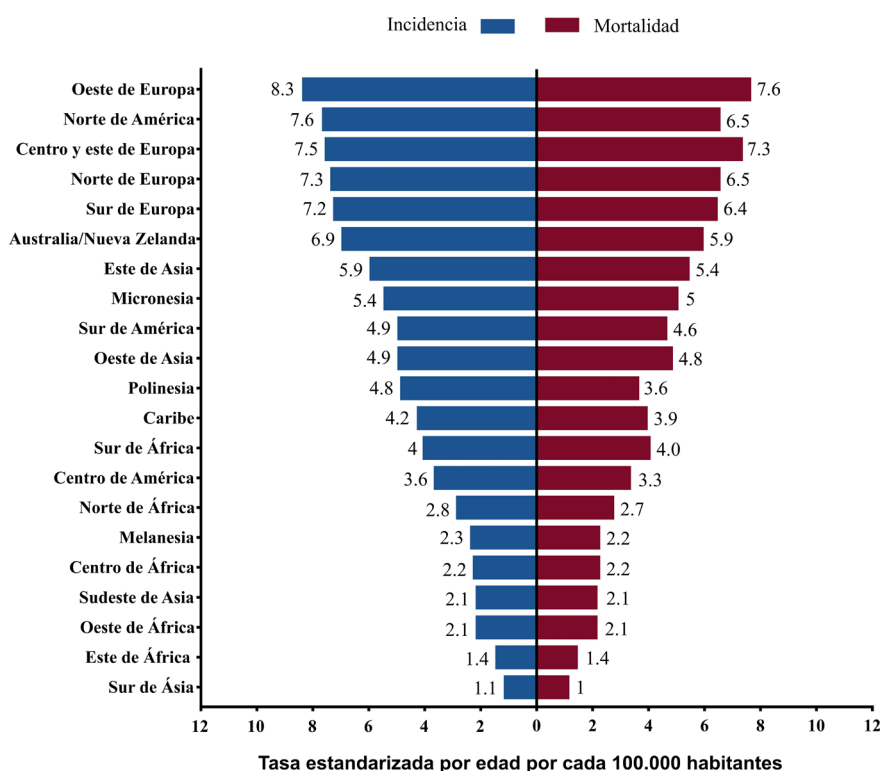


Figura 3. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer pancreático estandarizados por edad en 2018 (fuente: GLOBOCAN, 2018).

El estrecho paralelismo observado entre incidencia y mortalidad refleja el mal pronóstico de esta enfermedad. Esto se debe a que el 80-90% de los pacientes se

diagnostican en fases avanzadas, cuando el tumor no se puede extirpar quirúrgicamente, por la falta de sintomatología en etapas tempranas.

En 2018 se observó un aumento en la tasa de supervivencia a 5 años del CP del 6 al 9% desde 2014, lo que demuestra que se están haciendo progresos, especialmente en los países desarrollados [2]. La tendencia global del CP en el periodo 2018-2040 indica que la incidencia va a aumentar en un 77,7% mientras que la mortalidad lo va a hacer en un 79,9%. Dicha tendencia varía internacionalmente, el mayor incremento de incidencia se registrará en África (+114,1%), seguido de Latinoamérica y el Caribe (+99,3%). Por el contrario, el menor aumento se registrará en Europa (29,3%). Una situación similar ocurre con la mortalidad, el mayor aumento se observará en África (+114,8%) y en Latinoamérica y el Caribe (+101%) y el menor en Europa (+31,6%) [3].

1.1.2.3. Factores de riesgo

La etiología del CP ha sido ampliamente estudiada y se han identificado varios factores de riesgo que pueden dividirse en dos categorías: modificables y no modificables [18,19].

Dentro de los factores de riesgo modificables encontramos:

- **Tabaquismo.** La Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) ha confirmado que fumar está asociado con un mayor riesgo de CP. El riesgo es casi dos veces mayor en fumadores que en no fumadores.
- **Alcohol.** El riesgo de padecer CP está incrementado en personas que consumen altas cantidades diarias de alcohol (más de tres veces al día).
- **Obesidad.** Se ha demostrado que la obesidad aumenta la incidencia y mortalidad del CP y que cuanto mayor sea la edad de desarrollo de la misma, menor será la supervivencia general.
- **Dieta.** La dieta tiene un impacto del 30-50% en la incidencia de CP y hay evidencias de que ciertos alimentos están asociados con un mayor riesgo, mientras que otros tienen un papel protector. El consumo de carne roja, carne procesada, alimentos ricos en colesterol, fritos y otros alimentos con nitrosaminas podrían incrementar el riesgo de

padecer CP. En cambio, la elevada ingesta de frutas y vegetales, especialmente aquellas que contienen cítricos y antioxidantes, disminuye el riesgo de padecer CP.

- Exposición a sustancias tóxicas. La fracción etiológica de CP debida a la exposición ocupacional a sustancias químicas (especialmente metalurgia y pesticidas) se estima en un 12%. Se ha observado un mayor riesgo de CP en personas expuestas a níquel, cadmio o arsénico.

Los factores de riesgo no modificables incluyen:

- Género. El CP es más común en hombres que en mujeres.
- Edad. El CP predomina en personas de edad avanzada, la mayoría de los pacientes supera los 50 años.
- Diabetes mellitus. Existe una correlación positiva entre la diabetes, tipo I y II, y el riesgo de desarrollar CP.
- Historial familiar de CP. Se estima que entre el 5-10% de individuos con CP proceden de una familia con casos previos. El CP familiar se presenta en familias en las que un par de familiares de primer grado (padres, hermanos o hijos) han sido diagnosticados con CP.
- Factores genéticos. Las mutaciones genéticas están relacionadas positivamente con el riesgo de padecer CP. Aproximadamente el 10% de los pacientes tienen predisposición genética a desarrollar la enfermedad. Se han identificado varias mutaciones implicadas en el desarrollo de CP como aquellas que se producen en los genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *ARM*, *CDKN2A*, *APC*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, *PRSS1* y *STK11* [20]. También se ha observado una asociación con algunos síndromes familiares como el cáncer de colon hereditario sin poliposis (síndrome de Lynch), el síndrome de melanoma familiar con lunares atípicos múltiples, el síndrome de Peutz-Jeghers, el síndrome de cáncer hereditario de mama y ovario, la poliposis adenomatosa familiar (PAF) y el síndrome de Li-Fraumeni.
- Infecciones crónicas. La infección con *Helicobacter pylori* está asociada con un mayor riesgo de padecer la enfermedad, en un rango del 4-25%.
- Grupo sanguíneo. Se ha descrito una correlación positiva entre tener un grupo sanguíneo O- y el riesgo de desarrollar CP.

- Pancreatitis crónica. La pancreatitis es una inflamación del páncreas que puede ser aguda o crónica e induce daño pancreático debido a la activación prematura de enzimas digestivas. Episodios de pancreatitis aguda recurrentes pueden causar daño glandular y generar una pancreatitis crónica induciendo un proceso inflamatorio progresivo que finaliza con la destrucción del páncreas y resulta en la mala absorción de nutrientes, diabetes mellitus y dolor severo. Existen evidencias que relacionan la pancreatitis crónica con un elevado riesgo de desarrollar CP.

1.1.2.4. Sintomatología

Como ya se ha mencionado, el CP no muestra sintomatología en fases tempranas, de modo que la enfermedad sólo se hace aparente cuando el tumor invade el tejido circundante o metastatiza.

Los síntomas asociados a esta enfermedad incluyen dolor en el abdomen o en el centro de la espalda e ictericia obstructiva. Como resultado de la ictericia se produce una obstrucción de los conductos biliares que provoca una coloración amarilla de la piel y los ojos, prurito, orina oscura y acolia. Los pacientes también pueden mostrar anorexia, pérdida de peso, saciedad temprana, dispepsia y náuseas, causados por una obstrucción de la salida gástrica. La obstrucción del conducto pancreático a causa del tumor puede desarrollar pancreatitis. En estados más avanzados también puede aparecer trombosis, de tal forma que los pacientes sufren una hinchazón dolorosa de un brazo o pierna. Otros síntomas menos comunes incluyen la pancreatitis y la depresión. El 40% de los pacientes con CP tienen diabetes mellitus en el momento del diagnóstico [21].

En clínica, cuando hay sospechas de CP, inicialmente se realiza un examen físico en el que se examinan la piel, lengua y ojos en busca de síntomas de ictericia, así como la parte superior del abdomen, para comprobar si hay dolor o si se ha producido una acumulación anormal de líquido. A continuación, se realizan análisis de sangre para comprobar si hay niveles anormales de bilirrubina o de otras sustancias. Un marcador tumoral es el antígeno carbohidratado 19-9 (CA19-9), que suele aumentar cuando el tumor se expande [22]. Sin embargo, los altos niveles de CA19-9 también pueden producirse por otros motivos [23].

1.1.2.5. Tratamiento

El tratamiento utilizado frente al CP difiere en función de la etapa de desarrollo en que se encuentre el tumor tras el diagnóstico. Las diferentes etapas se muestran resumidas en la **Tabla 1**.

Si la enfermedad se diagnostica en fase I, normalmente se realiza la resección quirúrgica seguida de un tratamiento adyuvante de quimioterapia. La quimioterapia adyuvante suele iniciarse pasadas 8-12 semanas desde la cirugía, una vez el paciente se ha recuperado, y suele aplicarse durante 6 meses. Si el paciente se ha recuperado bien de la cirugía, la combinación de fármacos más utilizada es el FOLFIRINOX, que contiene 5-fluorouracilo (5-FU), oxaliplatino e irinotecán [24]. Otras opciones son: el tratamiento con gemcitabina (GEM) solo, GEM junto a capecitabina, o 5-FU con leucovorina.

A los pacientes con un CP en fase II o III se les suele realizar un tratamiento paliativo, seguido de un tratamiento neoadyuvante, que consiste en la aplicación de quimio y/o radioterapia con el objetivo de disminuir el tamaño del tumor y aumentar la eficacia de la cirugía. Tras el tratamiento neoadyuvante, se vuelve a evaluar la resección quirúrgica y, de ser posible, se realiza una pancreatectomía, mientras que en aquellos pacientes en los que el tumor no puede ser extirpado, se evalúa la quimioterapia seguida o no por radioterapia [25].

En pacientes en fase IV se suele optar por la quimioterapia utilizando un solo fármaco o la combinación de varios fármacos citotóxicos. Las principales opciones de quimioterapia son el FOLFIRINOX, GEM con nab-paclitaxel, GEM con 5-FU, o bien únicamente GEM en aquellos pacientes que no están en condiciones físicas de recibir un tratamiento combinatorio. Los efectos secundarios dependen de los fármacos utilizados, siendo los más comunes: bajo apetito, náuseas, vómitos, diarrea, problemas gastrointestinales, erupciones cutáneas, llagas en la boca, pérdida de cabello y falta de energía. En los pacientes con metástasis también es importante añadir tratamientos paliativos para aliviar los síntomas y los efectos secundarios de la quimioterapia.

En los últimos años se ha incrementado el estudio de las terapias dirigidas frente a genes o proteínas específicos. Este tipo de tratamiento disminuye el crecimiento y la

expansión del tumor, así como el daño en las células sanas. El erlotinib es un inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), el cual se ve alterado durante el desarrollo del tumor. Este fármaco se utiliza en clínica junto con la GEM en pacientes con CP avanzado [26]. Por otra parte, la inmunoterapia pretende potenciar las defensas naturales del organismo para combatir el cáncer. Un ejemplo de inmunoterapia, utilizado en casos en los que se ha observado una elevada inestabilidad de microsatélites, es el pembrolizumab, que es un anticuerpo frente a PD-1, una proteína localizada en los linfocitos T, que se encarga de controlar la respuesta inmune [27].

Los tratamientos paliativos van dirigidos a disminuir los síntomas de la enfermedad y los efectos secundarios del tratamiento.

1.1.3. Cáncer colorrectal

1.1.3.1. Características y clasificación

El colon y el recto forman parte del intestino grueso, encargado de la última fase de la digestión. El colon mide aproximadamente 1,5 m de longitud y se encarga de absorber el agua y los minerales de los alimentos antes de que sean eliminados por el organismo. Se divide en varias secciones: el colon ascendente, que incluye el ciego y el apéndice; el colon transversal, formado por las flexuras cólicas y el mesenterio; el colon descendente y el colon sigmoide, siendo este último tramo el que da lugar al recto, que es la parte final del tracto digestivo (**Figura 4**).

A nivel histológico el intestino grueso está formado por varias capas de tejido: la mucosa, la submucosa, la capa muscular y la serosa (**Figura 4**). La mucosa constituye la capa más interna y rodea el lumen del tracto gastrointestinal. A su vez, la mucosa se divide en el epitelio, que es la capa más interna, la lámina propia, que es una capa de tejido conectivo y la *muscularis mucosae*, que es una capa fina de músculo liso. A continuación, la submucosa consiste en una capa densa e irregular de tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, ganglios linfáticos y nervios que se ramifican en la mucosa y la capa muscular. La capa muscular está formada por dos capas gruesas de músculo y es la

responsable de los movimientos peristálticos del tracto gastrointestinal. Finalmente, la capa serosa es la más externa y está formada por varias capas de tejido conectivo.

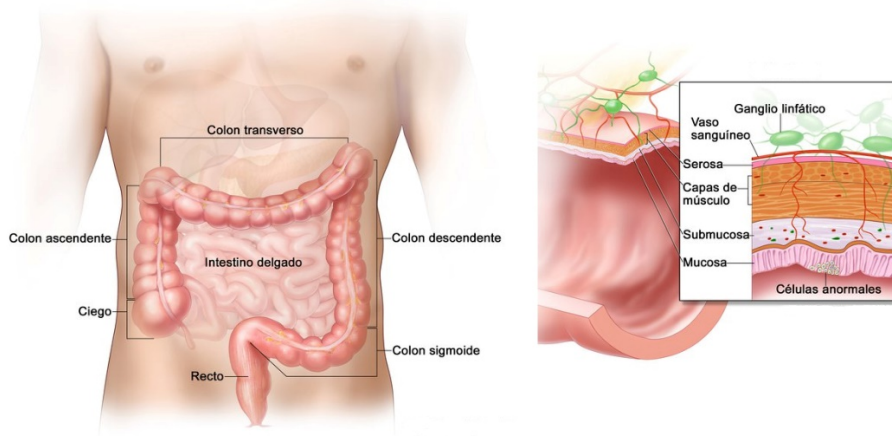


Figura 4. Anatomía del intestino grueso (fuente: Instituto Nacional del Cáncer, original de Terese Winslow).

El cáncer colorrectal (CCR) puede iniciarse a partir de las células epiteliales del colon o del recto. A menudo se inicia en forma de pólipo, una acumulación benigna de células que se desarrolla en la pared interna del colon o el recto. Los pólipos pueden detectarse mediante una colonoscopia y, si no son tratados o eliminados, se pueden convertir en cáncer colorrectal. Los pólipos se pueden diferenciar según la histología en [28]:

- Pólipo adenomatoso o adenoma. Se suele originar en el epitelio del colon o el recto, normalmente en pacientes con edades avanzadas. Los adenomas son los pólipos que tienen un mayor potencial de malignidad y, aun así, sólo una minoría se convierten en cáncer. La capacidad de desarrollar un cáncer viene determinada por el tamaño del pólipo, el tipo histológico, la presencia de displasia epitelial, la edad y el historial familiar de poliposis.
 - Adenoma tubular. Suele ser pequeño y forma una estructura de túbulos epiteliales. La mayoría de los adenomas (60-80%) son de este tipo, y son los que tienen menos potencialidad cancerígena.

- Adenoma vellosos. Es más voluminoso y presenta un mayor potencial de malignidad. Es el menos común y está formado por estructuras digitiformes de tejido conectivo recubiertas de células epiteliales.
- Adenoma túbulo-vellosos. Contiene características de ambos tipos y por lo tanto el potencial de malignidad también es intermedio.
- Adenoma serrado. Presenta áreas hiperplásicas y adenomatosas y es más maligno que un adenoma puro.
- Pólipo neoplásico no epitelial. Comprende los leiomiomas, lipomas, neurofibromas y hemangiomas.
- Pólipo hamartomatoso. No es neoplásico, aparece como resultado de un desarrollo defectuoso y normalmente está formado por una mezcla de tejidos. Es común en pacientes con el síndrome de poliposis juvenil o con en el síndrome de Peutz-Jegher.
- Pólipo hiperplásico. Es muy frecuente, de pequeño tamaño y se suele desarrollar en el colon distal y el recto, pero no se considera precanceroso.
- Pólipo inflamatorio. Está asociado con enfermedades inflamatorias como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.

El CCR más común es el adenocarcinoma, que constituye el 95-98% de todos los casos y engloba a los tumores que se inician en el tejido del colon y el recto [29]. En ocasiones, las células tumorales del adenocarcinoma se encuentran poco diferenciadas y secretan mucina, este tipo de tumor se conoce como adenocarcinoma mucinoso o coloide e incluye el 10-15% de los adenocarcinomas colorrectales. En cambio, si la mucina no se secreta, sino que permanece en el interior de la célula tumoral, el núcleo se desplaza hacia la periferia y da lugar al adenocarcinoma de células en anillo de sello. Este último incluye el 1% de los adenocarcinomas y es el más agresivo y difícil de tratar [30].

Otros tipos de CCR menos comunes son:

- Tumor neuroendocrino del tracto gastrointestinal. Se desarrolla en células neuroendocrinas encargadas de la regulación de la producción hormonal. Crece lentamente y conforma el 1% de todos los casos de cáncer colorrectal.

- Tumor del estroma gastrointestinal. Se forma en las células intersticiales de Cajal y es muy poco común. Son sarcomas que se inician en tejidos conectivos que incluyen grasa, músculo, vasos sanguíneos, nervios, huesos y cartílagos.
- Leiomiosarcoma. Este tipo de CCR incluye el 0,1% de todos los casos y se inicia en las células musculares del colon y el recto.
- Linfoma primario. Es un tipo de linfoma no Hodgkin y se desarrolla en el sistema linfático, especialmente en los linfocitos. Puede desarrollarse en muchas partes del organismo incluyendo los ganglios linfáticos, la médula ósea, el bazo, el timo y el tracto digestivo. Los linfomas colorrectales constituyen el 0,5% de todos los casos de CCR, ocurre en edades avanzadas y es más común en hombres.

Cuando el CCR crece hacia la pared del colon o el recto, puede penetrar en el sistema circulatorio o los ganglios linfáticos, permitiendo la metástasis a órganos distantes. El alcance del tumor determina la fase de desarrollo y, por lo tanto, el pronóstico del paciente. Los tumores *in situ* son pólipos que aún no han invadido la pared del colon o el recto y, por lo tanto, no se denominan CCR. Los tumores locales son aquellos que han crecido hacia la pared, pero aún no se han extendido más allá. Los tumores regionales son los que han invadido ganglios linfáticos o tejidos cercanos, mientras que los tumores distantes son los que presentan metástasis en órganos distantes como los pulmones o el hígado.

La mayoría de los casos de CCR suelen desarrollarse a partir de lesiones benignas que acumulan una serie de mutaciones, que se conoce como el modelo adenoma-carcinoma [31]. Este proceso puede desarrollarse mediante tres vías: inestabilidad cromosómica, que es la más común, inestabilidad de microsatélites y el fenotipo metilador de islas CpG [32]. Según este modelo, el proceso de carcinogénesis se inicia a partir de la activación de oncogenes y/o inactivación de genes supresores de tumores. Generalmente, se produce una mutación inicial en el gen supresor de tumores *APC* (del inglés, *Adenomatous Polyposis Coli*), seguido de una segunda mutación en el oncogén *KRAS* (homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata Kirsten). Estas dos mutaciones darán lugar a un proceso de expansión clonal que causará mutaciones somáticas en varios genes convirtiendo a la célula en maligna. Algunos de estos genes incluyen: *DCC* (del

inglés, *Deleted in Colorectal Cancer*), P53 y SMAD2/4 (del inglés, *Mothers Against Decapentaplegic homolog2/4*) [32].

Al igual que sucede con el CP, en clínica se utiliza el sistema de clasificación TNM adaptado al CCR tras obtener los resultados de las pruebas de diagnóstico de imagen. Tras los resultados de la clasificación TNM, se determina la etapa de desarrollo del tumor, que permite realizar un diagnóstico y aplicar al paciente el tratamiento adecuado. En este tipo de tumor también se determinan diferentes grados en función de las similitudes de las células cancerosas con las células sanas. El grado determinará la facilidad del tumor para expandirse, de tal forma que cuanto menor sea dicho grado, mejor será el pronóstico [33]. El sistema de clasificación TNM, junto con los estadios o etapas y el grado histopatológico vienen representados en la **Tabla 2**.

T (Tumor localizado)	
Tx	No puede ser evaluado.
T0	No hay evidencias de cáncer en el colon o el recto.
Tis	El tumor ha invadido el epitelio o lámina propia.
T1	El tumor ha invadido la submucosa.
T2	El tumor ha invadido la capa muscular.
T3	El tumor ha invadido la capa subserosa o ha crecido en tejidos que rodean el colon o el recto.
T4a	El tumor ha atravesado todas las capas del colon.
T4b	El tumor ha invadido o se ha unido a otros órganos o estructuras.
N (Implica nódulos linfáticos)	
Nx	No puede ser evaluado.
N0	No se ha expandido a nódulos linfáticos.
N1a	El tumor se ha expandido a 1 nódulo linfático.
N1b	El tumor se ha expandido a 2-3 nódulos linfáticos.
N1c	Hay depósitos tumorales en las estructuras cercanas al colon sin expansión a los nódulos linfáticos.
N2a	El tumor se ha expandido a 4-6 nódulos linfáticos.
N2b	El tumor se ha expandido a ≥ 7 nódulos linfáticos.
M (El tumor se ha extendido a otros órganos)	
M0	La enfermedad no se ha expandido a otros órganos.
M1a	El cáncer se ha expandido a otro órgano.
M1b	El cáncer se ha expandido a > 1 órgano.
M1c	El cáncer se ha expandido a la superficie peritoneal.

NOTA: La Tabla 2 continúa en la siguiente página.

Etapa	
0	El tumor está localizado y las células tumorales están solo en la mucosa o el revestimiento interno del colon o el recto (Tis, N0, M0).
I	El tumor ha crecido a través de la mucosa y ha invadido la capa muscular del colon o el recto. No se ha extendido a tejidos o nódulos linfáticos cercanos (T1/T2, N0, M0).
IIA	El tumor ha crecido a través de la pared del colon o el recto, pero no se ha extendido a tejidos o nódulos linfáticos cercanos (T3, N0, M0).
IIB	El tumor ha crecido a través del peritoneo visceral pero no se ha extendido a nódulos linfáticos cercanos (T4a, N0, M0).
IIC	El tumor se ha extendido a través de la pared del colon o recto y ha crecido en estructuras cercanas. No se ha expandido a nódulos linfáticos cercanos. (T4b, N0, M0).
IIIA	El tumor ha crecido a través del revestimiento interno o hacia las capas musculares del intestino. Se ha expandido a 1-3 nódulos linfáticos o bien a un nódulo tumoral en los tejidos circundantes al colon o el recto, pero no se ha extendido a otras partes del organismo (T1/T2, N1/N1c, M0 o T1, N2a, M0).
IIIB	El tumor ha crecido a través de la pared intestinal o hacia los órganos circundantes y dentro de 1-3 nódulos linfáticos o hacia un nódulo tumoral en los tejidos circundantes al colon o el recto. No se ha extendido a otras partes del organismo (T3/T4a, N1/N1c, M0; T2/T3, N2a, M0 o T1/T2, N2b, M0).
IIIC	El tumor se ha expandido a ≥ 4 nódulos linfáticos, pero no a otras partes del organismo (T4a, N2a, M0; T3/T4a, N2b, M0 o T4b, N1/N2, M0).
IVA	El tumor se ha extendido a otro órgano, por ejemplo, el hígado o los pulmones. (cualquier T, cualquier N, M1a).
IVB	El tumor se ha extendido a más de un órgano (cualquier T, cualquier N, M1b).
IVC	El tumor se ha extendido al peritoneo. Puede haberse expandido a otros órganos (cualquier T, cualquier N, M1c).
Recurrente	El cáncer se ha vuelto a producir tras el tratamiento. Se repetirán las pruebas que se hicieron en el diagnóstico inicial.
Grado	
GX	No se puede identificar el grado tumoral.
G1	Las células están bien diferenciadas, es decir, son muy similares a las células sanas.
G2	Las células están moderadamente diferenciadas, es decir, se asemejan a las células sanas.
G3	Las células están mal diferenciadas, es decir, se parecen poco a las células sanas.
G4	Las células están desdiferenciadas, es decir, apenas se parecen a células sanas.

Tabla 2. Sistema de clasificación TNM para determinar la fase del CCR (fuente: Unión Internacional Contra el Cáncer, [33]).

1.1.3.2. Epidemiología

Se estima que en 2018 se diagnosticaron 1,8 millones (10,3%) de nuevos casos de CCR y 881.000 (9,2%) muertes. El cáncer de colon se clasifica como el cuarto tipo de cáncer de mayor incidencia, mientras que el cáncer rectal se posiciona en el octavo puesto. Con respecto a la mortalidad, el cáncer de colon ocupa la quinta posición (5,8%) mientras que

el cáncer rectal es el décimo (3,2%) tipo de cáncer con mayor mortalidad. En conjunto, el CCR es el tercer tipo de cáncer más común y el segundo con más mortalidad [2].

El CCR es más común en hombres que en mujeres. En 2018 se estima que se diagnosticaron 1.006.000 casos en hombres y 795.000 en mujeres. Estos valores de incidencia implican que el riesgo acumulativo de padecer CCR en hombres menores de 74 años es del 2,71% y en mujeres del 1,77%. Los cánceres de colon y recto suelen desarrollarse más comúnmente en países desarrollados. En cuanto al cáncer de colon, la zona con mayor incidencia es el sur de Europa, seguida de Australia/Nueva Zelanda y el norte de Europa, mientras que el cáncer rectal es más común en el este de Europa, Australia/Nueva Zelanda y el este de Asia (Figura 5) [2].

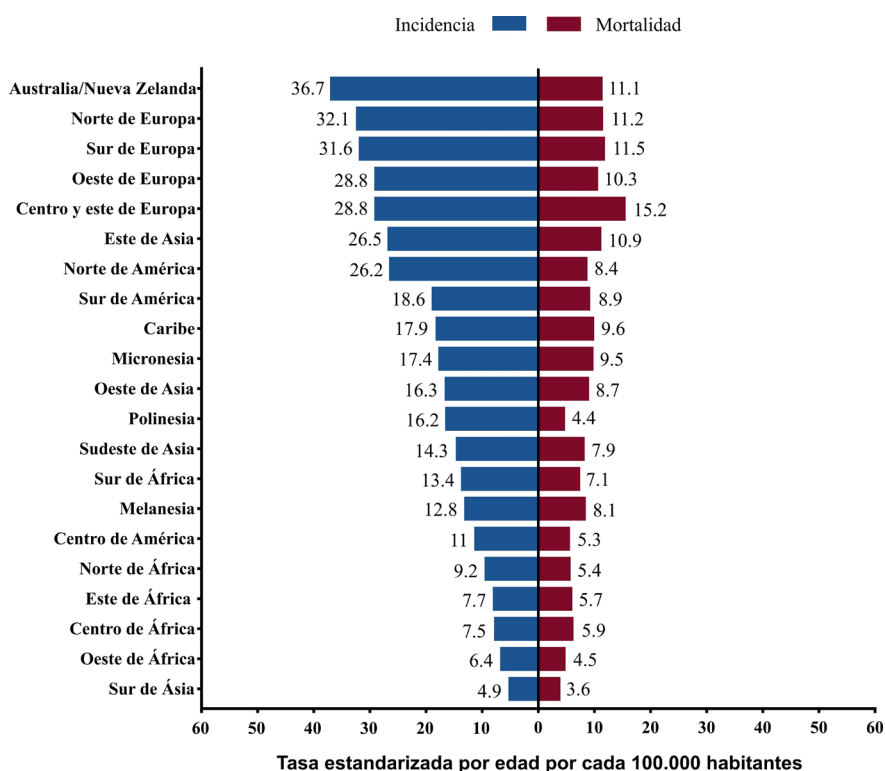


Figura 5. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer colorrectal estandarizados por edad en 2018 (fuente: GLOBOCAN, 2018).

El riesgo acumulativo de muerte por cáncer de colon entre los hombres es del 0,66% y entre las mujeres del 0,44% y para el cáncer rectal el riesgo acumulativo es del 0,46% para los hombres y del 0,26% para las mujeres [2].

La relación entre las tendencias en la incidencia y la mortalidad del CCR se puede dividir en tres categorías en función del nivel de desarrollo. Los países en vías de desarrollo han experimentado un aumento tanto en incidencia como en mortalidad en la última década, probablemente a causa de la transición económica. En los países desarrollados se ha producido un aumento en la incidencia y una disminución de la mortalidad, debido a la optimización de los tratamientos. Finalmente, los países con mayor nivel de desarrollo han experimentado una bajada tanto de la incidencia como de la mortalidad como consecuencia de la mejora en las estrategias de prevención y tratamiento [34].

1.1.3.3. Factores de riesgo

Tanto el estilo de vida como ciertas mutaciones oncogénicas hereditarias o espontáneas pueden promover el crecimiento de los pólipos y su conversión en tumores malignos. Realizar cambios en el modo de vida junto con las colonoscopias tempranas y las evaluaciones genéticas pueden prevenir el desarrollo del CCR. A continuación, se muestran los factores de riesgo modificables y los no modificables [35,36].

Factores de riesgo modificables:

- **Obesidad e inactividad física.** Son los principales contribuyentes a nivel conductual para el desarrollo del CCR. Se ha demostrado que las personas activas físicamente tienen menos posibilidades de desarrollar CCR, mientras que los más sedentarios tienen un riesgo incrementado del 50% de desarrollar la enfermedad.
- **Dieta.** La dieta puede afectar positiva o negativamente al desarrollo de CCR debido a su impacto en el microbioma del colon. Los alimentos pueden tener diferentes efectos sobre la población de microflora y la inflamación intestinal. La carne roja y la carne procesada aumentan el riesgo de padecer CCR, en cambio, el calcio, la fibra, la vitamina D y las frutas y verduras tienen un efecto protector frente al CCR.
- **Tabaquismo.** En 2009, la IARC determinó que fumar predispone al desarrollo de CCR, aumentando la probabilidad de desarrollar tumores asociados a anomalías moleculares como la inestabilidad de microsatélites, la metilación en islas CpG y la mutación en el oncogén *BRAF* (homólogo del oncogén viral del sarcoma murino B) debido a las sustancias mutagénicas del humo del tabaco.

- Alcohol. El consumo de alcohol moderado o alto se asocia con un mayor riesgo de padecer CCR. Las personas que consumen 2-3 bebidas alcohólicas al día tienen un riesgo superior del 20% de desarrollar CCR.
- Medicación. El consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos a largo plazo, como la aspirina, reduce el riesgo de padecer CCR. Los antiinflamatorios no esteroideos disminuyen la inflamación intestinal, sin embargo, se asocian con un mayor riesgo de hemorragia gastrointestinal y ataque cardíaco, por lo que no se recomienda su consumo para la prevención del CCR.
- Diabetes. En muchos casos, el riesgo de padecer CCR asociado a diabetes viene determinado por su relación con la obesidad y el sedentarismo. Sin embargo, los pacientes con diabetes tipo 2, muestran un riesgo aumentado de padecer CCR incluso disminuyendo el índice de masa corporal, aumentando la actividad física y mejorando otros factores relacionados.

Factores de riesgo no modificables:

- Sexo. En general, los hombres tienen más posibilidades de desarrollar CCR.
- Edad. La probabilidad de desarrollar CCR aumenta en edades avanzadas, sobre todo a partir de los 65 años.
- Mutaciones hereditarias. El 7-10% de todos los casos de CCR son de tipo hereditario, y hasta un 30% de los pacientes con CCR describen algún caso de la enfermedad en la familia, lo que indica que probablemente existen mutaciones todavía no identificadas, que predisponen al CCR. El CCR hereditario más común se conoce como síndrome de Lynch, que da lugar al 2-4% de todos los casos. Este síndrome afecta a los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *EpCAM* y *PMS2*, mostrando un patrón de herencia autosómico dominante. Los individuos que presentan la enfermedad tienen un riesgo del 20% de desarrollar CCR a los 50 años y del 50% de desarrollarlo a los 70 años. El segundo síndrome hereditario más común es la PAF, dando lugar a menos del 1% de los casos. Los pacientes con PAF tienen miles de pólipos colorrectales precancerosos a los 10-12 años, con un riesgo de casi el 100% de desarrollar CCR a los 40 años.

- Enfermedad inflamatoria intestinal. Se caracteriza por presentar una inflamación en el colon durante largos periodos de tiempo. Las principales causas de la enfermedad inflamatoria intestinal son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn.
- Radiación abdominal. Los supervivientes de un cáncer durante la infancia, que han recibido radiación en el abdomen, tienen un mayor riesgo de padecer neoplasias gastrointestinales como adultos, siendo la mayoría CCR.
- Fibrosis quística. Hay estudios que demuestran que los pacientes de fibrosis quística tienen un mayor riesgo de desarrollar CCR.
- Colectectomía. La colectectomía se asocia con un mayor riesgo de padecer cáncer de colon, probablemente debido a la exposición intestinal a la bilis.
- Terapia de privación de andrógenos. En pacientes de cáncer de próstata sometidos a una terapia de privación de andrógenos con agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina u orquiectomía se ha observado un mayor riesgo de CCR.

1.1.3.4. Sintomatología

El CCR es una enfermedad asintomática hasta que alcanza una etapa avanzada. Se puede observar un amplio rango de síntomas entre los que encontramos: hemorragia rectal, cambios en los hábitos intestinales (diarrea o estreñimiento), pérdida de peso, cansancio o fatiga constantes, anemia y dolor abdominal [37].

Puesto que los síntomas no aparecen hasta que la enfermedad se encuentra en fases avanzadas, es importante realizar reconocimientos regulares en función de la edad (a partir de los 45-50 años) y del historial familiar o personal de CCR, pólipos adenomatosos, enfermedad inflamatoria intestinal o de algún síndrome de CCR hereditario.

La colonoscopia es la prueba más comúnmente utilizada y permite observar el colon y el recto para detectar la presencia de pólipos o de CCR. Si se detecta algún pólipo durante la prueba, se puede extirpar directamente para prevenir que desarrolle un CCR. El tejido que se extrae durante la colonoscopia se suele analizar para realizar la clasificación TNM y determinar la etapa de desarrollo de la enfermedad. Adicionalmente, se realizan analíticas de sangre para detectar anemia y determinar los niveles de antígeno

carcinoembrionario (CEA), ya que altos niveles podrían indicar la presencia de metástasis [38].

1.1.3.5. Tratamiento

El tratamiento utilizado con cada paciente va a depender del tipo de CCR y del estadio, así como de los efectos secundarios. Los diferentes estadios del CCR se indican en la **Tabla 2**.

Si durante la colonoscopia se detecta la presencia de pólipos benignos en el paciente, se realiza una polipectomía mediante resección mucosa endoscópica o disección submucosa endoscópica, en función del tamaño del pólipo. En cambio, si se detecta un tumor en fase I o en fase II se extirpa quirúrgicamente o, en el caso de ser un paciente de alto riesgo con un tumor en fase II, tras la cirugía es posible que se deba añadir un tratamiento adyuvante con quimio o radioterapia. En cambio, si el paciente ha alcanzado la fase III del tumor, tras la resección normalmente recibirá un tratamiento adyuvante para asegurar la eliminación completa de las células tumorales remanentes [39]. Finalmente, si el tumor ha metastatizado, el tratamiento podría incluir una combinación de cirugía, radioterapia, inmunoterapia y quimioterapia, además de tratamientos paliativos para aliviar los síntomas y efectos secundarios del tratamiento.

La cirugía implica una colectomía (colon) o proctocolectomía (recto) parcial para asegurar la eliminación de los ganglios linfáticos drenantes. Ambas cirugías se pueden realizar mediante cirugía normal o laparoscopia, en ésta última, las incisiones son más pequeñas y, por lo tanto, el tiempo de recuperación es más corto [40]. En cualquiera de los casos, tras la resección se debe realizar una anastomosis, que es la unión de los dos extremos [38].

Los agentes quimioterapéuticos más comúnmente utilizados son: Capecitabina, 5-FU, Irinotecán, Oxaliplatino y Trifluridina/Tipiracilo. Estos fármacos se pueden utilizar aislados o en combinación: FOLFOX (5-FU, leucovorina, oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU, leucovorina, irinotecan), XELIRI/CAPIRI (capecitabina, irinotecan), XELOX/CAPEOX (capecitabina, oxaliplatino). La quimioterapia puede causar vómitos, náuseas, diarrea,

neuropatía o llagas en la boca, sin embargo, existen tratamientos que disminuyen estos efectos secundarios.

La radioterapia puede ser utilizada como tratamiento neoadyuvante, para disminuir el tamaño del tumor antes de realizar la cirugía, o adyuvante para facilitar la eliminación de las células tumorales remanentes. Normalmente, se utiliza en combinación con quimioterapia para aumentar la efectividad.

Por otra parte, existen terapias dirigidas que han sido aprobadas y que pueden utilizarse por sí solas o en combinación con quimioterapia. Por ejemplo, existen tratamientos anti-angiogénicos como el Bevacizumab, Regorafenib, Ziv-aflibercept y Ramucirumab, y también inhibidores de EGFR como el Cetuximab y el Panitumumab, aunque estos últimos no funcionan en tumores que tengan mutaciones en *RAS*. Finalmente, en tumores con la mutación V600E en el gen *BRAF*, se recomienda utilizar inhibidores de BRAF. Otro tipo de terapia dirigida es la inmunoterapia, algunos de los fármacos utilizados son el Pembrolizumab y el Nivolumab, ambos dirigidos a pacientes con CCR metastático que muestran inestabilidad de microsatélites o deficiencia en la reparación de bases mal apareadas [41].

Tras el tratamiento, el 30-50% de los pacientes recae y la mayoría de ellos mueren a causa de la enfermedad, siendo necesario realizar un seguimiento regular del paciente para poder detectar una recaída lo antes posible. Aunque se ha logrado disminuir la mortalidad del CCR gracias a los sistemas de prevención y de detección temprana de la enfermedad, en muchos casos los tratamientos existentes no son eficaces, por lo que es necesario seguir investigando para identificar marcadores moleculares que permitan avanzar en el diagnóstico y en el tratamiento personalizado del CCR.

1.1.4. Tumores del sistema nervioso central

1.1.4.1. Características y clasificación

El sistema nervioso central (SNC) está formado por el encéfalo y la médula espinal y controla todos los movimientos y acciones del individuo. El encéfalo se divide en tres

partes: cerebro, cerebelo y el tallo cerebral, está rodeado por las meninges y protegido por una envoltura ósea, el cráneo (**Figura 6**).

- Cerebro. Es la parte más grande y está formada por dos hemisferios, que controlan la región opuesta del organismo y se conectan a través del cuerpo caloso. A su vez, está dividido en cuatro lóbulos: frontal, parietal, temporal y occipital (**Figura 6**).
- Cerebelo. Se encuentra en la parte trasera del encéfalo justo debajo del cerebro y es responsable de la coordinación y el equilibrio.
- Tallo cerebral o tronco encefálico. Conecta el cerebelo a la médula espinal y controla las funciones involuntarias y esenciales del organismo.
- Meninges. Son las tres membranas que rodean y protegen el encéfalo y la médula espinal, y se conocen como piamadre, aracnoides y duramadre. Entre ellas encontramos líquido cefalorraquídeo circulando alrededor del cerebro y la médula espinal.

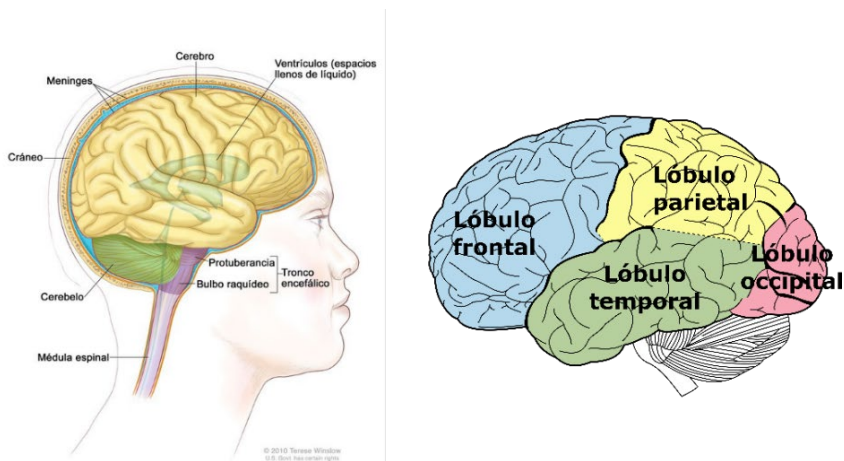


Figura 6. Anatomía del SNC (fuente: Instituto Nacional del Cáncer, original de Terese Winslow).

Los tumores cerebrales primarios son aquellos que se inician en el cerebro y se dividen en tumores de bajo grado, si tienen un crecimiento lento, y de alto grado si crecen más rápido. Los tumores cerebrales secundarios se inician en otra localización y metastatizan hacia el cerebro. En adultos, los tumores cerebrales secundarios son más comunes que los primarios.

Los tumores cerebrales se pueden clasificar en función de si se inician a partir de células gliales o células precursoras de la glía, conocidos como gliomas, o a partir de otros tipos celulares. Las células gliales se encuentran en el tejido nervioso rodeando a las neuronas, que son las responsables de la función nerviosa, y proporcionándoles un soporte estructural y metabólico. Entre las células gliales del sistema nervioso central podemos diferenciar astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células endoteliales.

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes y se clasifican en función del tipo de célula glial al que afectan y del grado o agresividad del tumor [42]. Los gliomas de alto grado son más agresivos y crecen más rápidamente que los de bajo grado. De este modo, entre los gliomas encontramos:

- **Astrocitoma.** Es el tipo de glioma más común (75%) y deriva de los astrocitos.
 - Grado I o astrocitoma pilocítico. Normalmente constituye un tumor benigno que raramente se expande al tejido cercano. Es más común en niños que en adultos.
 - Grado II o astrocitoma difuso de bajo grado. A menudo puede expandirse al tejido cercano convirtiéndose en un glioma de alto grado.
 - Grado III o astrocitoma anaplásico. Es un tumor maligno que crece rápidamente y se expande a los tejidos cercanos.
 - Grado IV o glioblastoma (GBM). Es el astrocitoma más agresivo y con peor pronóstico. Aproximadamente la mitad de los gliomas son GBM y constituye el tumor cerebral maligno más común en adultos. En el año 2010, un estudio dividió los GBM en cuatro subtipos (proneural, neural, clásico y mesenquimal), según los perfiles de expresión génica detectados en un microarray realizado en 200 pacientes [43].
- **Oligodendroglioma.** Se forma a partir de los oligodendrocitos, responsables de la formación de mielina, que rodea a los nervios y es rica en proteínas y lípidos. Se divide en oligodendrogliomas de bajo grado y oligodendrogliomas anaplásicos.
- **Ependimoma.** Se inicia en las células endoteliales del cerebro y la médula espinal donde se forma y almacena el líquido cefalorraquídeo. Los ependimomas de bajo grado se pueden localizar en la parte inferior de la columna vertebral (ependimoma mixopapilar) o cerca de un ventrículo (subependimoma) mientras que los

ependimomas de grado II son los más comunes y se suelen encontrar cerca del sistema ventricular en la médula espinal.

- Glioma de tronco encefálico. Se inicia en las células del tronco encefálico y son más comunes en la infancia. Normalmente se trata de tumores difusos con muy mal pronóstico, aunque también los hay focalizados.

Entre los tumores del SNC que no se forman a partir de células gliales, se pueden diferenciar:

- Meningioma. Se inicia en las meninges y normalmente es benigno, aunque puede generar graves síntomas si crece presionando el cerebro o la médula espinal o si crece en el tejido cerebral.
- Tumores de la glándula pituitaria y pineal. Este tipo de tumores no suele generar problemas de salud, aunque pueden afectar al balance hormonal del organismo llegando a provocar trastornos endocrinos como el síndrome de Cushing y el hipertiroidismo.
- Linfoma primario del SNC. Suele aparecer en pacientes con inmunodeficiencia severa y se forma a partir de linfocitos B. Al poder propagarse a través del SNC, puede localizarse en varias regiones cerebrales, aunque es más común en los hemisferios. También puede expandirse hacia el líquido cefalorraquídeo y a los ojos.
- Meduloblastoma. Es el tumor cerebral más común en la infancia, se inicia normalmente en el cerebelo y suele tener muy mal pronóstico.
- Craneofaringioma. Es muy raro, benigno y normalmente se inicia a partir del tejido embrionario de la glándula pituitaria.
- Schwannoma. Es poco común y normalmente es benigno. Se inicia en las células de Schwann, que producen la vaina de mielina que cubre los nervios periféricos.

En clínica se suelen dividir los tumores según la clasificación TNM, como ya se ha mencionado. Sin embargo, en los tumores cerebrales no se suele aplicar este tipo de clasificación puesto que normalmente no se expanden más allá del SNC. En este tipo de tumores se determina el tipo y grado del tumor para aplicar el tratamiento óptimo al paciente. Para ello, se evalúan la histología del tumor, la edad del paciente, los síntomas,

la cantidad de tumor residual tras la cirugía, la localización, las características moleculares, el estado neurológico, la metástasis y la recurrencia del tumor.

Existen algunas mutaciones genéticas que determinan el pronóstico y en muchos casos el tipo de tumor. Las más utilizadas en clínica son: los genes de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (*IDH1/2*), el silenciamiento epigenético de la O⁶-metilguanina-ADN-metiltransferasa (*MGMT*) y la codeleción de los brazos cromosómicos 1p/19q.

- *IDH1/2*: Las mutaciones en los genes de *IDH1* e *IDH2* son indicadores de gliomas de bajo grado, y cuando aparecen en gliomas de alto grado, suele indicar que son tumores que han evolucionado a partir de gliomas de bajo grado. Normalmente estas mutaciones se asocian con un pronóstico más favorable [44].
- *MGMT*. El silenciamiento epigenético de *MGMT* se produce mediante la metilación del promotor e implica una disminución de la capacidad del tumor para reparar el daño en el ADN generado por la quimioterapia [45]. La metilación de *MGMT* correlaciona con una mejor respuesta a los agentes alquilantes utilizados en quimioterapia [46].
- Codeleción de 1p/19q. Implica una mayor sensibilidad a los tratamientos de quimio y radioterapia [47].

La clasificación de los tipos de tumores del SNC publicada por la OMS en 2016 viene determinada tanto por la histología como por las mutaciones moleculares. Los oligodendrogliomas se caracterizan por presentar la mutación en *IDH1/2* y la codeleción de 1p/19q y los astrocitomas suelen tener mutados *TP53* y *ATRX*. La **Figura 7** muestra un esquema simplificado de la clasificación de los gliomas realizada por la OMS [48].

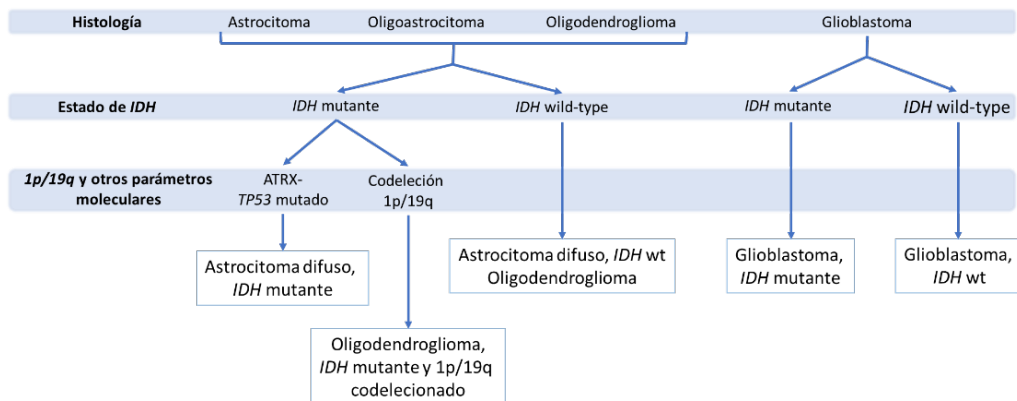


Figura 7. Clasificación simplificada de los gliomas según la OMS.

1.1.4.2. Epidemiología

Se estima que en 2018 se diagnosticaron 296.851 (1,6%) nuevos casos de tumores del SNC y 241.037 (2,5%) muertes. Los tumores del SNC están clasificados en 18ª posición en cuanto a incidencia y en 12ª posición en cuanto a mortalidad [2]. Aunque no es un tipo de cáncer muy común, su importancia radica en que presentan una elevada incidencia en niños y adultos jóvenes, causando en ellos el 20-30% de las muertes por cáncer. En niños, los tumores del SNC más comunes son el astrocitoma pilocítico, los tumores embrionarios del SNC y los gliomas malignos, mientras que en adultos, los más comunes son los meningiomas, los tumores pituitarios y los GBM [49].

La incidencia y mortalidad de los tumores del SNC son más altas en hombres que en mujeres. Se estima que en 2018 el 55% (162.534 casos) de los tumores del SNC tuvieron lugar en hombres, mientras que el 45% (134.317 casos) se produjo en mujeres. Dichos porcentajes se mantienen en cuanto a la mortalidad, de tal forma que tuvieron lugar 135.843 muertes por tumores del SNC en hombres y 105.194 en mujeres. Estos valores implican que el riesgo acumulativo de padecer un tumor del SNC en hombres menores de 74 años es de 0,4% y en mujeres del 0,31%, y el riesgo de muerte sería del 0,35% y 0,25% en hombres y mujeres, respectivamente [2].

Los tumores del SNC son más comunes en Europa, seguido de Australia/Nueva Zelanda y el norte de América. En cambio, los índices más altos de mortalidad se observan en el sur, centro y este de Europa, Australia/Nueva Zelanda y el oeste de Asia (**Figura 8**) [2].

En las últimas décadas, la incidencia de los tumores en el SNC se ha incrementado en todas las regiones, excepto en el este de Europa donde se ha mantenido estable. Sin embargo, la mortalidad ha disminuido en los países con mayor índice de desarrollo, probablemente debido a los avances en la detección y el tratamiento del cáncer [50].

Introducción

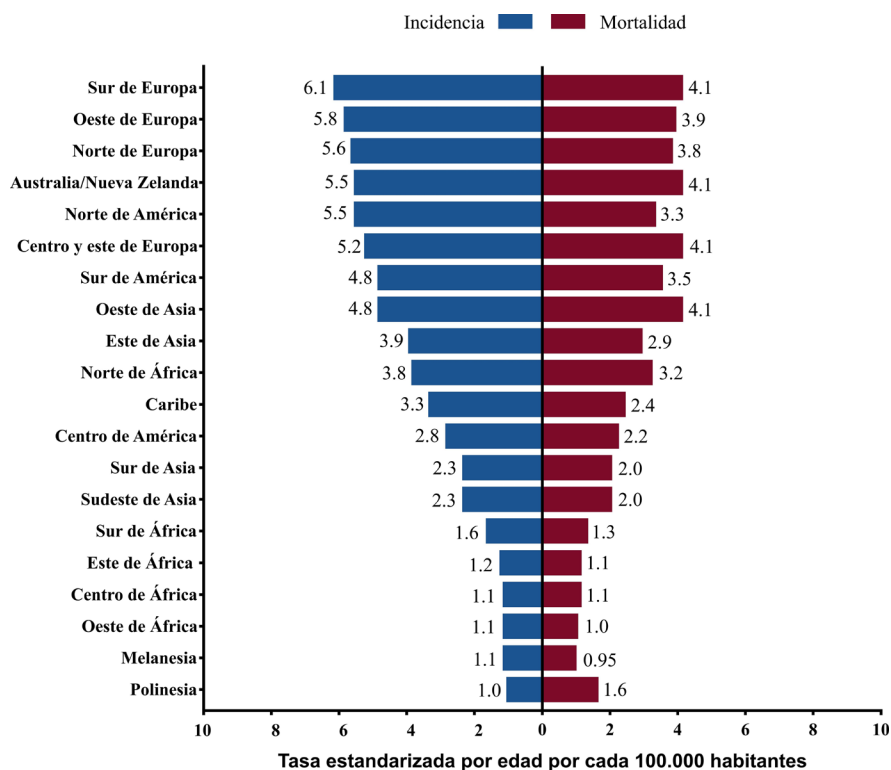


Figura 8. Tasa de incidencia y mortalidad del cáncer del SNC estandarizados por edad en 2018 (fuente: GLOBOCAN, 2018).

1.1.4.3. Factores de riesgo

La incidencia de los tumores primarios del SNC varía con la edad y el sexo del paciente. Aunque son más comunes en personas con edades avanzadas, pueden aparecer a cualquier edad e incluso, como se ha mostrado anteriormente, hay algunos tipos de tumores del SNC que son más frecuentes durante la infancia. Con respecto al sexo, los tumores cerebrales suelen aparecer más en hombres que en mujeres, pero algunos tipos de tumores, como los meningiomas y los tumores pituitarios, son más comunes en mujeres [51].

Se han realizado multitud de estudios epidemiológicos para la detección de factores de riesgo ambientales que relacionen la exposición a diferentes sustancias en el ámbito laboral y social (alcohol, tabaco, dieta, compuestos químicos, etc.) con el desarrollo de tumores del SNC. Sin embargo, la mayoría han sido descartados o aún no existen evidencias suficientes para su confirmación. Entre los factores de riesgo para los

que se ha demostrado una asociación con los tumores del SNC se encuentran la radiación ionizante, factores genéticos y algunas condiciones autoinmunes como la alergia [52].

- Radiación ionizante. No sólo implica a aquellas personas expuestas a radiaciones durante el periodo laboral (trabajadores nucleares) sino que también incluye la radiación utilizada con fines terapéuticos. La mayor parte de tumores relacionados con este tipo de exposición son meningiomas, gliomas y schwannomas.
- Factores genéticos y síndromes hereditarios. Alrededor del 5% de los casos de gliomas están ligados a factores genéticos hereditarios. Algunos de los síndromes genéticos asociados son la neurofibromatosis, la esclerosis tuberosa, el síndrome de Li-Fraumeni, la enfermedad de Cowden y el síndrome de Turcot.
- Alergias y enfermedades autoinmunes. Existen evidencias que demuestran una correlación negativa entre padecer alergias y enfermedades autoinmunes y el riesgo de gliomas. Aunque se desconoce el mecanismo, debe estar relacionado con la elevada activación del sistema inmune en este tipo de pacientes.

1.1.4.4. Sintomatología

Los pacientes con tumores cerebrales pueden sufrir síntomas localizados o generalizados durante días, semanas o meses dependiendo de la agresividad y localización del tumor [53].

Los tumores desarrollados en ciertas regiones del cerebro pueden generar déficits neuronales y por lo tanto son diagnosticados más rápidamente. Aquellos situados en el lóbulo frontal suelen generar debilidad o disfasia, los que se encuentran en el lóbulo parietal pueden causar entumecimiento, heminegligencia (incapacidad para responder a los estímulos enviados por el hemisferio contrario al que ha recibido el daño) y desorientación espacial, y los tumores que implican radiaciones ópticas, ya sea en los lóbulos temporal, parietal u occipital causan defectos en el campo visual. En cambio, los tumores en el lóbulo prefrontal, temporal o en el cuerpo calloso resultan en disfunciones cognitivas más sutiles como cambios de personalidad, trastornos del estado de ánimo y déficits de memoria a corto plazo. Los tumores localizados en el cerebelo pueden generar parálisis de nervios craneales, disfunción cerebelosa y alteraciones motoras o sensitivas.

Los tumores cerebrales también pueden causar síntomas generalizados independientemente de la región en la que se encuentren. Por ejemplo, el 50-80% de los pacientes puede tener convulsiones, el 30% padecerá dolores de cabeza y el 15% sufrirá presión intracraneal, con dolores de cabeza progresivos que empeoran por la noche, náuseas y vómitos matutinos, somnolencia, visión borrosa y diplopía horizontal por parálisis del VI nervio craneal.

1.1.4.5. Tratamiento

Tras la exploración física y neurológica y los análisis de sangre correspondientes, si hay sospecha de cáncer cerebral se realizarán las pruebas de imagen por tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética de imagen (RMI) para determinar la localización y el tamaño del tumor y si está asociado a edema cerebral. La RMI proporciona una mayor resolución y es una guía más precisa para la resección quirúrgica que la TC. En cambio, la TC es más útil para demostrar la presencia de hemorragias agudas. Estas técnicas se suelen utilizar en combinación con la resonancia magnética espectroscópica (RME), que proporciona información sobre la presencia y proporción de metabolitos como el N-acetil-aspartato, creatina, colina y lactato.

Las técnicas de imagen permiten diagnosticar la presencia de un tumor cerebral, sin embargo, para determinar el tipo y el grado del tumor es necesaria la obtención de tejido tumoral ya sea por biopsia o cirugía. Si el tumor es muy pequeño o se encuentra en una región del cerebro a la que no se puede acceder fácilmente, se suele realizar una biopsia estereotáctica, en cambio, si el tumor es accesible quirúrgicamente se suele intentar la extirpación total o parcial mediante una craneotomía [52].

Una vez obtenida la muestra de tejido, se realiza un análisis histológico para poder determinar el grado del tumor y catalogarlo dentro del sistema de clasificación establecido por la OMS (WHO, del inglés *World Health Organization*), que se basa en la caracterización morfológica, histológica y molecular, para establecer la mejor estrategia terapéutica para cada paciente [54]. A continuación, se explican los tratamientos utilizados comúnmente frente a los principales tipos de gliomas junto con un esquema-resumen (**Figura 9**).

- Los pacientes de astrocitoma pilocítico (WHO I) tienen un buen pronóstico, aunque en general la supervivencia disminuye en edades avanzadas [51]. La resección total es la mejor opción en este tipo de tumores [55].
- Para los pacientes con gliomas difusos de bajo grado (WHO II), como es el caso de los astrocitomas difusos y oligodendrogliomas, el tratamiento se inicia con la resección del tumor [56]. El tratamiento postoperatorio se basará en el riesgo del glioma, que viene definido por la edad, el daño neurológico y la caracterización molecular. Los tumores de bajo riesgo se corresponden con pacientes menores de 40 años, neurológicamente intactos y que presentan mutación en *IDH1/2* solo o junto a la codeleción de 1p/19q [57]. La mejor opción en dicho caso es la resección total del tumor seguida por radioterapia [58]. En los pacientes con tumores de alto riesgo se suele aplicar radioterapia focalizada tras la cirugía, seguida de un tratamiento adyuvante de quimioterapia con procarbazona, lomustina y vincristina (PCV) [59]. Actualmente, se ha sustituido el PCV por lomustina o por temozolomida (TMZ), debido a su menor toxicidad, a que la vincristina no atraviesa la barrera hematoencefálica y a la baja eficacia de la procarbazona [60].
- Los gliomas difusos de alto grado (WHO III) incluyen astrocitomas y oligodendrogliomas anaplásicos. El tratamiento estándar para pacientes con estos tumores es la resección quirúrgica seguida por un tratamiento de radioterapia junto con PCV adyuvante o bien con TMZ concurrente y adyuvante [61].
- Los GBM (WHO IV) son los tumores cerebrales más letales, la mayoría de pacientes no sobrevive más de un año y, solo el 5% sobrevive más de 5 años [51]. En estos pacientes sólo ha demostrado mejorar el pronóstico el tratamiento con radioterapia con TMZ concurrente y diaria, seguido por TMZ adyuvante [62]. En pacientes mayores de 70 años, ha demostrado ser más eficaz el tratamiento hipofraccionado con radioterapia, es decir, utilizando dosis más altas pero reduciendo el periodo de tratamiento [63].
- Los ependimomas (WHO I-II-III) representan alrededor del 2% de los tumores del SNC y el 7% de todos los gliomas y suelen afectar a niños y a adultos jóvenes [51]. El tratamiento principal es la resección quirúrgica total y, en el caso de lograr una resección parcial, se suele evaluar repetir la operación. En los pacientes con grado I y

II, la resección total suele ser suficiente para curar la enfermedad. En pacientes con grado II en los que se ha obtenido una resección parcial y en pacientes de grado III se suele aplicar radioterapia tras la cirugía [64].

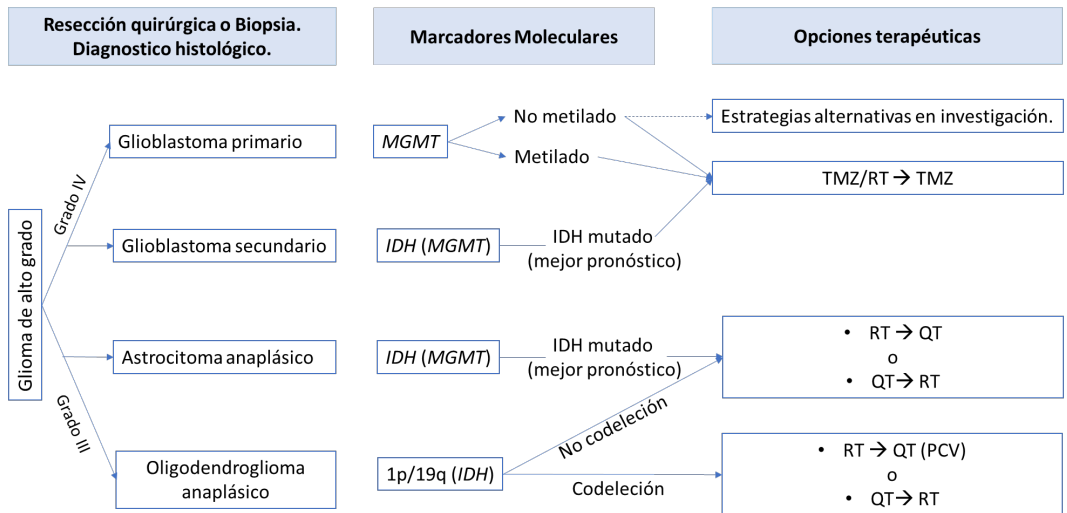


Figura 9. Algoritmo de tratamientos para gliomas de alto grado.

Existen tratamientos paliativos para aliviar los síntomas de la enfermedad y del propio tratamiento. Para aquellos pacientes que sufren convulsiones se suele aplicar un tratamiento con fármacos antiepilépticos. Es importante utilizar el menor número de fármacos posible y también las dosis más bajas para evitar efectos secundarios e interacciones entre los tratamientos. Por otra parte, casi todos los pacientes de tumores cerebrales reciben corticosteroides frente a los edemas vasogénicos [65]. Finalmente, los tumores cerebrales confieren un alto riesgo a padecer un tromboembolismo venoso tras la cirugía. Por ello, normalmente se recomienda una profilaxis postoperatoria con medias de compresión y heparina de bajo peso molecular [66].

A pesar de los progresos realizados durante los últimos años en cuanto a los mecanismos moleculares de los tumores cerebrales, existen pocas terapias efectivas. Esto se debe a la baja penetración de la barrera hematoencefálica de los fármacos, la heterogeneidad molecular del tumor y la falta de biomarcadores validados. Actualmente, hay muchas estrategias terapéuticas en fases de evaluación basadas en inmunoterapia, terapia dirigida, terapia génica y nuevas tecnologías de administración de medicamentos

para evitar la barrera hematoencefálica. Probablemente, será necesaria una combinación de varios tratamientos para lograr una respuesta antitumoral efectiva y duradera.

1.2. Nuevos enfoques terapéuticos

Las estrategias anticancerígenas convencionales se basan fundamentalmente en la resección del tumor mediante cirugía, en combinación con tratamientos de quimioterapia y radioterapia. La quimio y la radioterapia no son tratamientos específicos, por lo que dañan tanto al tumor como al tejido sano, generando efectos adversos en los pacientes. Normalmente presentan una baja eficacia debido tanto a la heterogeneidad del tumor, que puede desarrollar fenotipos resistentes promovidos por una presión selectiva tras la administración del tratamiento, como a la dificultad para penetrar en el mismo por la elevada presión en el centro del tejido tumoral.

Durante los últimos años se ha investigado en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas más específicas, efectivas y menos invasivas que los tratamientos actuales y que a su vez reduzcan la citotoxicidad en el tejido sano y eviten los mecanismos de resistencia desarrollados por las células tumorales. Algunas de ellas incluyen: nanomedicina, vesículas extracelulares, antioxidantes naturales, terapia dirigida e inmunoterapia, terapia génica y enzimática, ablación térmica y radiómica y patómica (**Figura 10**). La combinación de varias de estas estrategias terapéuticas es clave para proporcionar tratamientos personalizados a los pacientes y obtener el mejor resultado.

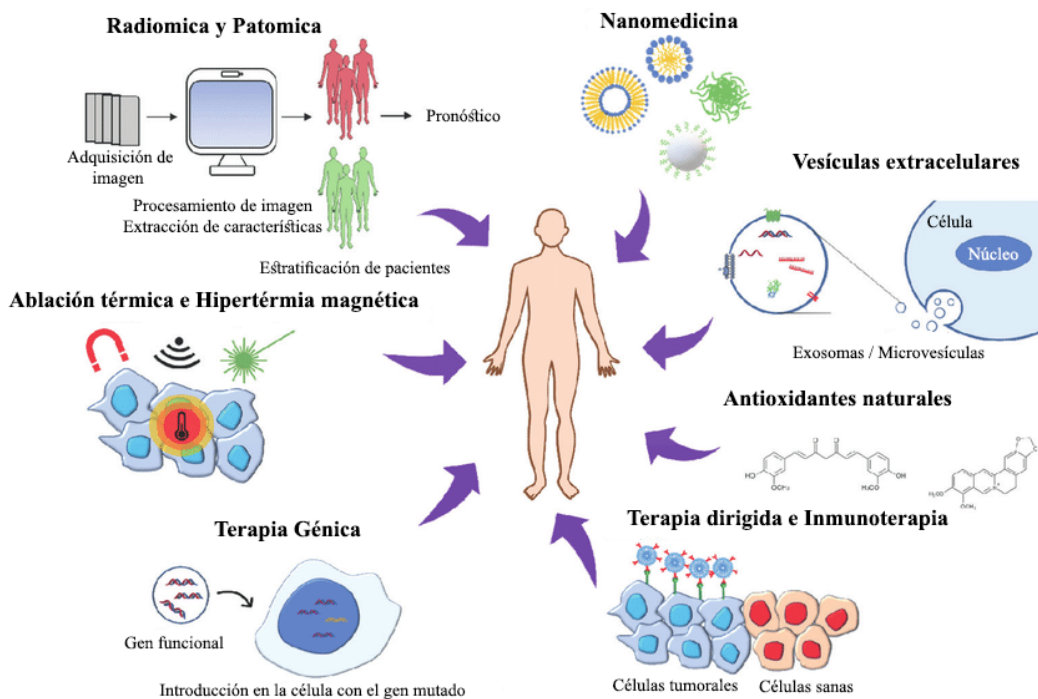


Figura 10. Nuevas estrategias terapéuticas frente al cáncer (adaptada de Pucci, 2019 [67]).

1.2.1. Terapia génica/enzimática suicida

La terapia génica consiste básicamente en introducir un gen funcional para reemplazar a otro que se encuentra ausente o mutado, o un transgén con el fin de obtener un beneficio terapéutico. En la actualidad, existen diferentes estrategias para la terapia génica anticancerígena: a) terapia génica suicida, que consiste en introducir genes que favorezcan la apoptosis o sensibilicen a la quimioterapia; b) compensación de mutaciones para corregir genes supresores de tumores o inhibir la expresión de oncogenes mediante ARN interferentes; c) potenciación de la respuesta inmune del individuo introduciendo genes capaces de aumentar la inmunogenicidad del tumor o de potenciar la actividad antitumoral de las células del sistema inmune; y d) inhibición de la proliferación tumoral mediante una terapia antiangiogénica.

Dentro de la terapia génica suicida existen dos posibilidades: por un lado, introducir en las células tumorales genes que codifiquen toxinas o, por otro lado, introducir genes que codifiquen enzimas capaces de activar profármacos específicos para

generar metabolitos tóxicos. Este último proceso comprende dos pasos, primero el gen que codifica la enzima se dirige específicamente hacia el tumor y, a continuación, se administra un profármaco inocuo que es sustrato de la enzima codificada y que al entrar en contacto con ella dará lugar al fármaco anticancerígeno (**Figura 11**). La terapia enzimática se basa en el mismo fundamento, pero en lugar del gen, se dirige directamente la enzima hacia el tumor. Como resultado, la terapia suicida aumenta el índice terapéutico en comparación con los tratamientos convencionales, ya que introduce altas concentraciones de compuestos citotóxicos en el ambiente tumoral minimizando el impacto en el tejido normal.

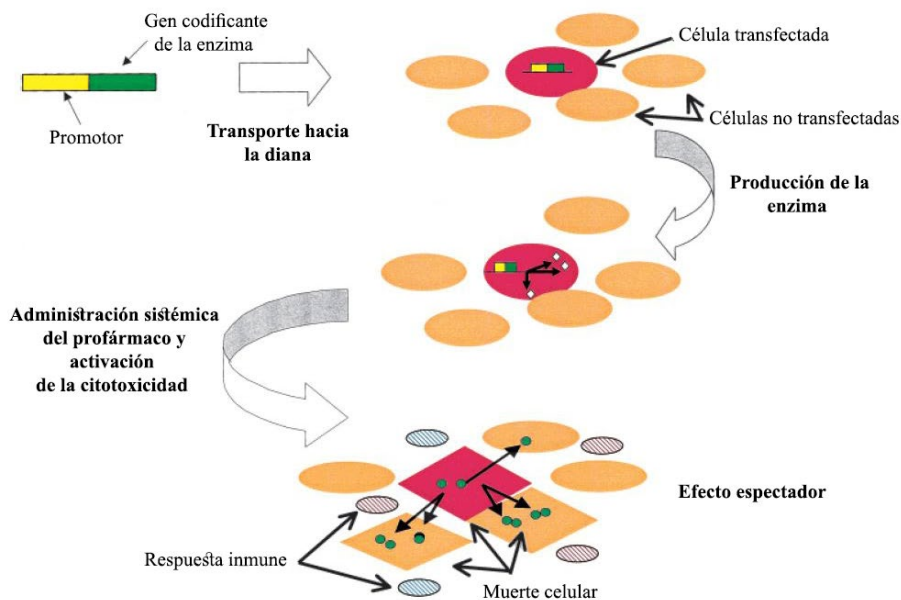


Figura 11. Esquema de la terapia génica suicida (adaptada de Greco, 2001 [68]).

Este tipo de tratamiento presenta varias ventajas con respecto a las terapias convencionales. En primer lugar, se puede lograr una elevada selectividad hacia las células tumorales por ejemplo, poniendo el transgén bajo el control de un promotor específico de los tumores tratados, aumentando su especificidad y reduciendo los efectos adversos en los tejidos normales [69]. Además, se obtienen concentraciones del fármaco activo en el tumor más altas en comparación con la quimioterapia. Otra ventaja de este tipo de tratamiento es el efecto espectador, que implica la destrucción de las células adyacentes

a la que se ha dirigido el gen. Este efecto puede permitir que la expresión del transgén en menos del 10% de las células tumorales sea suficiente para destruir a toda la población tumoral y se genera debido a la transferencia de metabolitos tóxicos desde las células transfectadas hacia las no transfectadas, ya sea pasiva o activamente. Se cree que las uniones gap son las responsables de este efecto, ya que permiten la difusión mediada por gradiente de concentración de metabolitos tóxicos desde las células transfectadas a las células vecinas, aunque también puede deberse a la endocitosis de los cuerpos apoptóticos liberados por las células transfectadas [68]. Por otra parte, es posible que adicionalmente, tanto la introducción del gen como el efecto generado por la enzima, activen una respuesta inmune que potencie el efecto terapéutico. Finalmente, el profármaco no tiene por qué ser específico de las células tumorales ya que por sí mismo es inocuo [70].

El éxito de la terapia génica suicida viene mediado por la correcta selección de la enzima, del profármaco y del sistema de transporte. Las enzimas pueden ser de origen humano o de origen viral y bacteriano, las segundas son más inmunogénicas pero las primeras pueden generar toxicidad fuera de las células tumorales. Además, las enzimas deben acumularse en una concentración suficiente y tener una elevada actividad catalítica para poder activar el profármaco en condiciones fisiológicas. En cuanto al profármaco, debe ser un sustrato eficiente y específico de la enzima, que al entrar en contacto con ella genere potentes citotoxinas que causen la muerte celular en cualquiera de las fases del ciclo celular. Puesto que la eficiencia de la introducción de genes en las células es normalmente baja, tanto los profármacos como los metabolitos tóxicos que generan deberían presentar buenas propiedades de distribución con el fin de maximizar la efectividad de la terapia potenciando el efecto espectador. Finalmente, es importante seleccionar un sistema de transporte, ya sea viral o no viral, que permita dirigir de forma específica al gen hacia la célula diana y que además no sea tóxico ni inmunogénico *per se*.

Algunas de las combinaciones que han sido más estudiadas son: timidina quinasa y ganciclovir, citosina desaminasa y 5-fluorocitosina, nitroreductasa y CB1954, carboxipeptidasa G2 y mostaza nitrogenada, citocromo P450 y oxazafosforina o el sistema purina nucleósido fosforilasa y 6-metilpurina desoxirribosido [71]. Sin embargo, a día de

hoy, aunque ha habido varios sistemas enzima/profármaco que han demostrado ser muy eficaces a nivel preclínico, ninguno ha logrado obtener efectos significativos en la fase clínica [71]. Puesto que el principal problema es la eficacia y no la seguridad, es necesario optimizar el sistema de transporte, la baja expresión de los transgenes, la tasa de conversión del profármaco y el efecto espectador.

1.2.2. Nanomedicina

Las nanopartículas son sistemas coloidales muy pequeños (1-1.000 nm) con una elevada relación superficie-volumen, cuya morfología y propiedades dependen de los componentes y de los protocolos de síntesis. En el campo de la biomedicina, pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos, transportadores de fármacos o como agentes de contraste para diagnóstico de imagen.

Las nanopartículas deben ser biocompatibles, estar bien caracterizadas y ser estables *in vivo*. Pueden ser diseñadas para potenciar su selectividad y eficacia hacia las células tumorales y presentan varias ventajas con respecto a los agentes quimioterapéuticos convencionales: pueden encapsular moléculas hidrofóbicas aumentando su solubilidad y biocompatibilidad, así como el tiempo de retención en los vasos sanguíneos tumorales, pueden conjugarse con ligandos específicos mejorando la penetración intracelular y potenciando la especificidad hacia la diana y, también pueden liberar el fármaco de forma estable y controlada. Actualmente, existen varios tipos de nanomateriales en investigación, y pueden clasificarse en función del material con el que se han sintetizado en inorgánicos y orgánicos.

- Las nanopartículas inorgánicas están formadas a partir de óxidos de metales o metales puros.
 - Nanocápsulas. Son partículas esféricas compuestas de un núcleo aislante (normalmente sílice) rodeado por una fina capa de metal. Debido a su estructura, cuando entran en contacto con luz de una determinada longitud de onda se activa un fenómeno de resonancia. La longitud de onda de excitación se puede modificar manipulando el grosor y tamaño de la nanopartícula. Existen dos tipos de

nanocápsulas, las que absorben la luz, utilizadas para generar hipertermia, y las que desvían la luz, que se utilizan como agentes de contraste [72].

- Nanopartículas de sílice. Tienen una estructura mesoporosa y una alta relación superficie volumen, lo que aumenta su capacidad de carga y permite una distribución homogénea de los fármacos. Son muy resistentes a la degradación y, en comparación con otras nanopartículas metálicas, son menos tóxicas y más biocompatibles [73].
- Nanopartículas de oro. Tienen propiedades ópticas y eléctricas particulares [74], baja toxicidad [75] y pueden ser modificadas para favorecer su biodegradabilidad [76]. Además, la síntesis es sencilla y genera buenos rendimientos. Se pueden utilizar como sistemas de transporte de fármacos [75], para terapia fotodinámica anticancerígena [77] y en diagnóstico para detectar biomarcadores en distintos tipos de enfermedades [74].
- Quantum Dots (QD). Son nanopartículas pequeñas (2-35 nm de diámetro) formadas de un material semiconductor, con propiedades electrónicas y ópticas características y con una alta relación superficie-volumen. Dichas propiedades pueden ser controladas mediante el tamaño del QD y utilizando envolturas de un semiconductor diferente. Tienen una alta intensidad de fluorescencia, son muy fotoestables y debido a sus estrechos picos de emisión permiten una detección muy sensible. Suelen utilizarse en técnicas de imagen, aunque también pueden funcionar como transportadores de fármacos [78,79].
- Nanopartículas de óxido de hierro. Pueden utilizarse como agentes de contraste en RMI, como tratamiento anticancerígeno por hipertermia y como transportadores específicos de fármacos. En función del tamaño pueden presentar propiedades superparamagnéticas. Las nanopartículas superparamagnéticas, al contrario que las ferromagnéticas, no mantienen la magnetización cuando se retira el campo magnético, sino que se produce un proceso de relajación en el que se libera calor. Esta propiedad puede utilizarse en la ablación térmica de tumores por hipertermia [80]. Nanotherm® ha sido aprobado para el tratamiento de GBM y está compuesto por nanopartículas de óxido de hierro de aproximadamente 15 nm cubiertas con aminosilano [81].

- Nanopartículas de óxido de cerio. Se pueden utilizar para el tratamiento de tumores debido a sus propiedades antioxidantes y a la capacidad de atrapar agentes quimioterapéuticos en su estructura porosa [82].
- Las nanopartículas orgánicas se sintetizan a partir de polímeros o lípidos.
 - Liposomas. Están formados por fosfolípidos, lípidos y colesterol. Debido a su naturaleza anfipática, los fosfolípidos en presencia de agua se ensamblan formando estructuras esféricas en las que la cabeza hidrofílica se dirige hacia el solvente y la parte hidrofóbica forma la bicapa lipídica. Los liposomas pueden tener una o más bicapas lipídicas englobando un núcleo acuoso, de esta forma pueden encapsular fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos. A menudo se añade una capa externa de polietilenglicol (PEG) para potenciar su estabilidad [83]. Son las nanopartículas más utilizadas para el transporte de fármacos, algunas de las formulaciones liposómicas aprobadas por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) para su uso en clínica frente a varios tipos de cáncer son: Doxil[®]/Caelix[™], Myocet[®], DaunoXome[®], Marqibo[®], Mepact[®] y Onivyde[®] [84,85].
 - Polimerosomas. Son análogos morfológicos de los liposomas, pero están compuestos de bloques de polímeros unidos entre sí mediante enlaces covalentes, uno de los bloques es hidrofílico, y el otro puede ser cualquier tipo de polímero biocompatible. Los bloques de copolímeros se pueden diseñar para presentar las características deseadas. Los polimerosomas son más estables y resistentes y menos permeables que los liposomas [86,87].
 - Micelas. Son agregados esféricos compuestos de macromoléculas anfipáticas en las que la parte hidrofílica se dirige hacia el solvente y la región hidrofóbica queda confinada en el núcleo. Las micelas encapsulan fármacos hidrofóbicos en el núcleo y los fármacos hidrofílicos quedan adsorbidos o unidos químicamente en la envoltura. La envoltura hidrofílica aumenta la solubilidad y la estabilidad de las nanopartículas en ambientes acuosos [88].
 - Nanopartículas poliméricas. Son esferas sólidas o nanocápsulas compuestas por polímeros biocompatibles y biodegradables, o polímeros naturales como el quitosano, alginato, gelatina y albúmina. Las nanopartículas poliméricas son estables, biodisponibles, proporcionan un elevado tiempo de circulación en sangre,

permiten la liberación controlada del fármaco y presentan mayor capacidad de carga que los liposomas [89]. Las nanopartículas de quitosano forman complejos electrostáticos con el ADN, constituyendo una buena opción como transportadores no virales de terapia génica [90]. Existen varios fármacos formados por nanopartículas poliméricas aprobados por la FDA, como Adagen®, Cimzia®, Macugen®, Neulasta®, Pegasys®, PegIntron®, Renagel® y Somavert® [91].

- Nanogeles. Son nanopartículas poliméricas en las que los polímeros se entrecruzan formando una red porosa que asegura una alta eficiencia en el atrapamiento del fármaco [92]. Además de la alta capacidad de encapsulación de fármacos, también aumentan la estabilidad de los mismos y el tiempo de circulación en sangre, presentan una toxicidad mínima, son biocompatibles y son capaces de liberar el fármaco en respuesta a estímulos (pH, campo magnético, luz, contenido iónico y temperatura) [93].
- Dendrímeros. Son un tipo de polímeros que forman una estructura peculiar caracterizada por un núcleo central y varias ramificaciones que terminan en varios grupos funcionales. Las ramificaciones se extienden de forma simétrica y radial desde el núcleo. Las ventajas de los dendrímeros son que su arquitectura se puede controlar con alta precisión y que su síntesis es muy versátil. En el núcleo pueden incorporar fármacos hidrofílicos o hidrofóbicos dependiendo de la naturaleza de los monómeros que componen la macromolécula [94,95]. Constituyen una buena opción como transportadores de fármacos debido a su tamaño nanométrico, su facilidad de síntesis, su monodispersidad, a que pueden incorporar múltiples fármacos, a que permiten una liberación controlada, a su baja toxicidad y elevada biocompatibilidad y a que pueden penetrar las membranas celulares [96].
- Nanopartículas lipídicas sólidas. Están formadas por lípidos sólidos a la temperatura corporal (ácidos grasos, esteroides, ceras, monoglicéridos, diglicéridos o triglicéridos). Durante la preparación, es necesario añadir un pequeño porcentaje de surfactantes o estabilizadores poliméricos en la solución acuosa debido a la alta hidrofobicidad de los lípidos. El tipo de lípido y surfactante utilizado afectará a las propiedades fisicoquímicas de las partículas [97]. Se suelen incluir lípidos PEGilados para aportar estabilidad estérica y permitir la funcionalización. Los fármacos

hidrofóbicos se encapsulan durante la fabricación mientras que los hidrofílicos necesitan ser unidos químicamente o disueltos en la envoltura de PEG. En comparación con los liposomas, las nanopartículas lipídicas aseguran una alta estabilidad del fármaco y una liberación prolongada debido a su estructura cristalina. Además, con respecto a otras nanopartículas orgánicas, no necesitan solventes orgánicos durante su fabricación, lo que las hace más seguras para los organismos. Sin embargo, la cristalinidad de las nanopartículas lipídicas sólidas puede causar baja eficiencia en la carga de fármacos y una lenta liberación de estos. Onpattro® ha sido recientemente aprobado por la FDA para el tratamiento de polineuropatías. Se trata del primer tratamiento basado en un ARN pequeño interferente (siRNA, del inglés *small interfering RNA*) transportado en nanopartículas lipídicas que ha sido aprobado para su uso en clínica [98].

1.3. Estrés oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas pequeñas que contienen oxígeno y son altamente reactivas. Estas moléculas se forman biológicamente en el interior de las células eucariotas, como un subproducto de la respiración aerobia que tiene lugar en las mitocondrias para producir energía. Las ROS en concentraciones bajas son beneficiosas para las células, ya que participan en la transducción de señales, la activación de enzimas, la expresión génica, la formación de enlaces disulfuro en el ensamblaje de nuevas proteínas y regulan la actividad de las caspasas durante la apoptosis [99]. Las ROS también pueden obtenerse de fuentes externas, entre las que encontramos la radiación ultravioleta (UV), compuestos químicos (contaminantes ambientales, tabaco, alcohol, etc.) y el ejercicio físico. Las principales ROS incluyen el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH^\cdot), el oxígeno singlete (1O_2) y el ozono (O_3) [100].

Para regular y controlar la cantidad de ROS en el organismo, las células disponen de moléculas antioxidantes, que pueden ser de tipo enzimático o no enzimático, obtenidas a partir del metabolismo y los nutrientes [101].

- Enzimas antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GRx), etc.
- Antioxidantes metabólicos: ácido lipoico, glutatión (GSH), L-arginina, coenzima Q10, melatonina, ácido úrico, bilirrubina, proteínas quelantes de metales, transferrina, etc.
- Antioxidantes obtenidos a través de la alimentación: vitaminas C y E, carotenoides, trazas de algunos metales (selenio, manganeso, zinc), flavonoides, ácidos grasos omega 3 y 6, etc.

Cuando desaparece el equilibrio existente entre las sustancias prooxidantes y antioxidantes se genera el llamado estrés oxidativo, en el que la acumulación excesiva de ROS es capaz de dañar el ADN, el ARN, los lípidos y las proteínas, pudiendo llegar a provocar la muerte de la célula. El estrés oxidativo suele aumentar con la edad y es clave en la aparición de varias enfermedades neurodegenerativas (alzhéimer, párkinson, esclerosis lateral amiotrófica), enfermedades inflamatorias (artritis reumatoide), enfermedades cardiovasculares (distrofia muscular), alergias, disfunciones del sistema inmune, diabetes y cáncer [99].

Las ROS son vitales para la iniciación, desarrollo y progresión del cáncer. Altos niveles de ROS pueden causar mutaciones que provoquen la activación constitutiva de oncogenes que favorecen la proliferación celular y la angiogénesis, pueden inactivar genes supresores de tumores y también alterar los mecanismos de reparación del ADN, dando lugar a la iniciación del proceso tumoral. La persistencia del estrés oxidativo en las células tumorales puede actuar como un mecanismo selectivo que permite que se produzca la selección clonal, generando gradualmente subconjuntos de células tumorales con nuevas características que aumentan su capacidad de proliferación y su resistencia a los mecanismos de muerte celular [102].

Una vez se ha generado el tumor, las células tumorales producen más ROS que las células sanas, debido a que tienen un mayor requerimiento energético y de síntesis de macromoléculas, para poder mantener la velocidad de crecimiento y proliferación del tumor. Para obtener mayores niveles de adenosin trifosfato (ATP), su síntesis aumenta tanto a través de la fosforilación oxidativa realizada en las mitocondrias, generando a su vez mayores niveles de ROS, como por la vía de la glucólisis anaeróbica, lo que se conoce

como el efecto Warburg [103]. En condiciones normales, el producto final de la glucólisis es el piruvato, mientras que, en las células tumorales, aun en condiciones aeróbicas, se genera lactato, que contribuye a aumentar la acidez en el ambiente del tumor y activa la respuesta inflamatoria, que también contribuye a un mayor estrés oxidativo [104]. Por otra parte, algunos de los síntomas producidos por los fármacos quimioterapéuticos también contribuyen al aumento de las ROS, como las náuseas y vómitos y la baja ingesta, que genera un déficit de vitaminas y otros antioxidantes obtenidos a través de la alimentación.

Sin embargo, aunque las células tumorales presentan mayores niveles de ROS y son más resistentes al daño generado por el estrés oxidativo que las células normales, un aumento excesivo en los niveles de ROS puede generar un bloqueo del ciclo celular, un aumento de la senescencia y finalmente, la muerte de las células tumorales (**Figura 12**) [105]. Por ello, presentan una estrecha regulación de los mecanismos de defensa antioxidantes, para poder mantener la homeostasis de ROS y no superar el umbral que causaría la muerte celular.

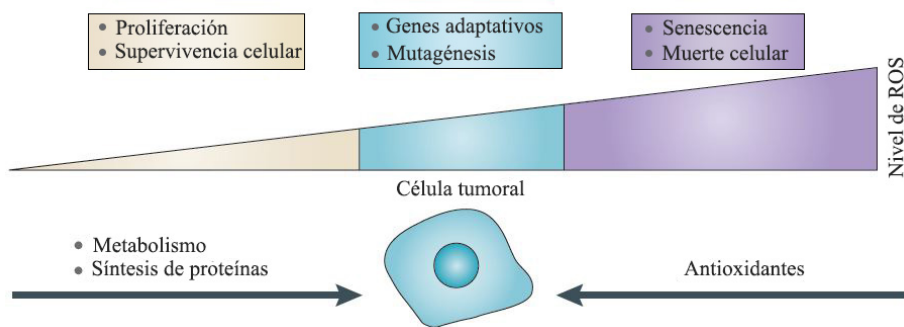


Figura 12. Relación entre los niveles de ROS y la supervivencia de las células tumorales (adaptada de Cairns, 2011 [105]).

El desarrollo de tratamientos que disminuyan los niveles de ROS intracelulares para prevenir la proliferación de las células tumorales podría ser una opción terapéutica. De hecho, hay estudios que demuestran que la ingesta de antioxidantes puede reducir el riesgo de padecer cáncer [106]. Sin embargo, también hay estudios a largo plazo que demuestran que, una vez desarrollado el tumor, la ingesta de antioxidantes podría

acelerar su desarrollo y aumentar su mortalidad [107]. En muchos casos, se recomienda que, durante los tratamientos con quimio y radioterapia, los pacientes ingieran antioxidantes para reducir la toxicidad y disminuir los efectos adversos [108], aunque hay controversia con el resultado a largo plazo, ya que en ocasiones se ha observado que disminuye la eficacia de los propios tratamientos [103].

Por otro lado, debido a los altos niveles de ROS en las células tumorales, éstas son más vulnerables a la muerte celular inducida por estrés oxidativo que las células normales. Así, es posible aumentar las ROS en las células tumorales tanto utilizando tratamientos generadores de ROS como inhibiendo los mecanismos antioxidantes que se encuentran potenciados en las células tumorales como alternativa terapéutica. Tanto los fármacos quimioterapéuticos como la radioterapia inducen altos niveles de ROS que son los responsables de la muerte de las células tumorales. De hecho, la resistencia a la quimio y radioterapia en muchos casos viene mediada por altos niveles de determinados antioxidantes presentes en las células tumorales. Un ejemplo es la alta concentración de GSH, de modo que los fármacos que inhiben el metabolismo de GSH mejoran la sensibilidad a las terapias convencionales [102]. También se han desarrollado inhibidores frente a otras proteínas que aumentan la capacidad antioxidante de las células tumorales (TRX, TR, SOD1, NRF2), que han demostrado aumentar el estrés oxidativo en algunos tipos de cáncer, potenciando la muerte celular y sensibilizando a las células frente a otros tratamientos [109].

1.4. D-aminoácido oxidasa

La enzima D-aminoácido oxidasa (DAO; EC 1.4.3.3.) cataliza la desaminación oxidativa de los D-aminoácidos (**Figura 13**). La DAO oxida el D-aminoácido en el correspondiente α -iminoácido, que se reordena en un α -cetoácido liberando amonio. Esta enzima es una flavoproteína, de modo que tiene unido el dinucleótido de flavina adenina (FAD), que actúa como coenzima. Cuando se produce la reacción catalítica, el FAD se reduce a FADH₂, quedando inactivo y requiere de oxígeno molecular para volver a

oxidarse y poder volver a actuar como coenzima. Tras esta reoxidación se libera H_2O_2 y el ciclo catalítico queda completo [110].

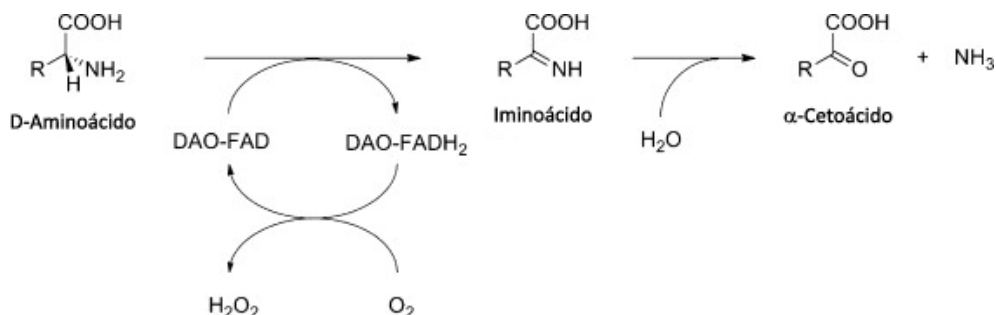


Figura 13. Reacción catalizada por la D-aminoácido oxidasa (adaptada de Ohide, 2011 [110]).

La DAO presenta diferentes funciones fisiológicas en función del organismo. Por ejemplo, en levaduras actúa como enzima catabólica para utilizar D-aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía; mientras que en otros organismos participa en la biosíntesis de tiamina (*Bacillus subtilis*) y del pigmento ocular (insectos). También se ha demostrado su contribución en la eliminación de D-aminoácidos en el intestino (peces) o riñones (mamíferos) y, en humanos, se ha demostrado que actúa como un neuromodulador de D-serina en el cerebro [111].

Aunque se puede encontrar en muchos organismos, la DAO procedente de *Rhodotorula gracilis* presenta una alta actividad catalítica, una interacción estable con el FAD y una estereoselectividad absoluta [112], de modo que los L-aminoácidos no actúan ni como inhibidores ni como sustrato de la enzima. Debido a su elevada estereoselectividad y especificidad de sustrato, la DAO se ha investigado como biocatalizador a nivel industrial [113,114], tanto en la conversión de cefalosporina C al ácido 7-aminocefalosporánico como en la resolución de mezclas racémicas. La DAO también se ha utilizado como biosensor para la detección de D-aminoácidos, como la D-serina, que tiene un papel fundamental en la plasticidad sináptica y en varias enfermedades neurológicas como la esquizofrenia, isquemia, epilepsia y el dolor crónico de origen neuropático. Por otra parte, se ha estudiado su aplicación en agricultura como sistema de selección en plantas transgénicas y como un nuevo mecanismo de resistencia a herbicidas [115].

La DAO presenta además un gran potencial como terapia génica o enzimática generadora de ROS frente a las células tumorales. Esto se debe a que los tejidos de mamíferos contienen muy bajos niveles de esta enzima y, de todos modos, la DAO endógena se encuentra en la matriz peroxisomal [116], donde también hay una alta actividad de CAT que puede detoxificar el peróxido de hidrógeno. La colocalización de la DAO endógena y la CAT, junto con su baja especificidad, explicarían la mínima toxicidad de los D-aminoácidos en los mamíferos. De hecho, hay estudios que demuestran que administrar altas dosis de D-Alanina en ratones no genera cambios histopatológicos en los riñones, que es donde se encuentra la actividad más alta de DAO [117]. Por lo tanto, su actividad enzimática podría ser regulada mediante la administración exógena de D-aminoácidos. Además, el H₂O₂ es relativamente estable, permeable a la membrana plasmática y citotóxico tanto para las células que proliferan como para las quiescentes [118].

Otras enzimas generadoras de ROS que se han evaluado como agentes anticancerígenos son la glucosa oxidasa (GO) y la xantina oxidasa (XO). En 1981, se observó que la GO conjugada con microesferas de látex carboxiladas era capaz de prevenir el crecimiento del tumor en ratones [119]. Posteriormente, se probó la GO encapsulada en liposomas frente a plasmacitomas en ratones [120], y también se demostró que la inyección de GO estabilizada en PEG en ratas con gliomas redujo significativamente el crecimiento del tumor [121]. Sin embargo, la regulación de la producción de ROS por la GO administrada es complicada debido a la alta disponibilidad de sus sustratos (oxígeno y glucosa). De hecho, la administración de esta enzima requirió el aporte de antioxidantes para minimizar la toxicidad sistémica. Lo mismo sucedió con la XO ya que, aunque su actividad enzimática es menor que la de la GO, la producción de superóxido no puede ser regulada *in vivo* debido a su baja especificidad de sustrato [121].

El primer estudio que evaluó la DAO como terapia anticancerígena tuvo lugar en 1998. Los investigadores lograron introducir el cDNA de la enzima de *R. gracilis* en el citoplasma de células de gliosarcoma de rata (9L) y expresar una proteína activa capaz de inducir toxicidad en presencia de D-Alanina [118]. Posteriormente, otros autores realizaron esta misma transfección empleando un retrovirus recombinante en las líneas

celulares 9L de gliosarcoma de rata, MCF-7 de cáncer de mama y SCC de carcinoma de células escamosas [123]. La terapia génica con DAO también se ha estudiado con el objetivo de potenciar el efecto de una terapia basada en la depleción energética inhibiendo la glucólisis con 3-bromopiruvato en células de gliomas de rata [124].

Otros estudios se han centrado en analizar el uso de la DAO como terapia enzimática. Se ha evaluado la utilización de la enzima conjugada con PEG, para aumentar su estabilidad y reducir su antigenicidad, sobre varias líneas celulares tumorales y no tumorales [125,126]. Posteriormente, se observó que una de las limitaciones del uso *in vivo* de la DAO era la baja concentración de oxígeno en la región tumoral, de modo que se realizó una evolución dirigida de la enzima para optimizar su actividad en presencia de bajas concentraciones de oxígeno y de D-aminoácidos, consiguiendo un aumento de los efectos citotóxicos de la enzima en células tumorales de ratón [127]. Con el objetivo de estabilizar la enzima y poder dirigirla hasta el tumor, otros autores inmovilizaron la DAO covalentemente en nanopartículas de Fe_3O_4 funcionalizadas con 3-amino-propiltriétoxissilano (APTES). El sistema Fe_3O_4 -APTES-DAO se utilizó en líneas tumorales de adenocarcinoma de ovario (SKOV-3), GBM (U87) y CCR (HCT116) y, aunque demostró ser más eficaz que la enzima libre, las nanopartículas presentaron citotoxicidad intrínseca [128].

Los estudios realizados hasta ahora parecen indicar que la DAO podría constituirse como un fármaco anticancerígeno eficaz, sin embargo, es necesario seguir profundizando en su efecto sobre células tumorales humanas, evaluar el mecanismo de muerte celular inducido y optimizar su vehiculización y concentración en la región tumoral mediante otro tipo de nanopartículas que no presenten citotoxicidad.

1.5. Muerte celular y cáncer

Durante muchos años, se ha creído que la muerte celular era un proceso inevitable que se producía mediante un mecanismo totalmente aleatorio. Sin embargo, las evidencias acumuladas en las últimas décadas demuestran que la eliminación de células dañadas o superfluas está mediada por un conjunto de mecanismos bien caracterizados. Es necesario diferenciar entre la muerte celular accidental, que normalmente ocurre como resultado de la exposición a graves daños físicos, químicos y mecánicos, y la muerte celular regulada, que implica una maquinaria molecular que puede ser regulada mediante intervenciones farmacológicas o genéticas.

La muerte celular regulada (MCR) puede ocurrir como consecuencia del desarrollo y renovación de tejidos, y es lo que se conoce como muerte celular programada, o bien como consecuencia de daños demasiado intensos o prolongados en el microambiente intra o extracelular, en los que la respuesta adaptativa no ha logrado restaurar la homeostasis celular.

Las principales formas de muerte celular se dividen en apoptosis, necrosis y autofagia. Sin embargo, en los últimos años se han identificado variaciones en los mecanismos moleculares de iniciación, ejecución y propagación de estas tres principales formas de muerte celular, de modo que actualmente se habla de un amplio rango de mecanismos de muerte celular interconectados entre sí y con un amplio espectro de características morfológicas e inmunorreguladoras (**Figura 14**). Para desarrollar tratamientos efectivos frente al cáncer y otras enfermedades caracterizadas por presentar alteraciones en la regulación de la muerte celular, es necesario comprender las diferentes formas de muerte celular.

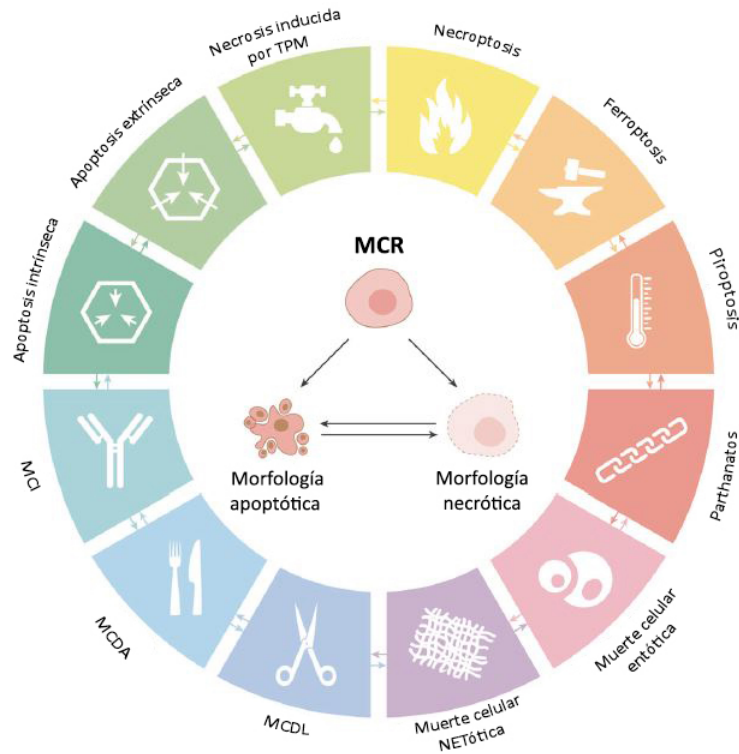


Figura 14. Principales formas de muerte celular (adaptada de Galluzzi, 2018 [129]). TPM: Transición de la permeabilidad mitocondrial; MCDL: Muerte celular dependiente de lisosomas; MCDA: Muerte celular dependiente de autofagia; MCI: Muerte celular inmunogénica.

1.5.1. Apoptosis

La apoptosis es el principal tipo de muerte celular programada y tiene lugar tanto durante el desarrollo del organismo para mantener la homeostasis de los tejidos, como en respuesta al daño producido por estímulos externos. A nivel morfológico, durante la apoptosis se puede observar la contracción de la membrana citoplasmática, la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo y la formación de invaginaciones en la membrana plasmática. A continuación, tiene lugar la expulsión del contenido celular en pequeñas vesículas conocidas como cuerpos apoptóticos, que finalmente son fagocitados por los macrófagos y degradados dentro de los lisosomas. El reconocimiento de las células apoptóticas por los fagocitos viene mediado por la modificación estructural y molecular de la membrana plasmática, que conlleva la externalización de la fosfatidilserina (PS).

En el proceso de iniciación y ejecución de la apoptosis intervienen las caspasas, una familia de proteasas que se sintetizan como pro-enzimas y, por lo tanto, tienen que ser activadas o bien mediante proteólisis o interaccionando con un activador alostérico. Dependiendo del estímulo y de las caspasas que activan el proceso de apoptosis se pueden distinguir varias vías de señalización (**Figura 15**) [130].

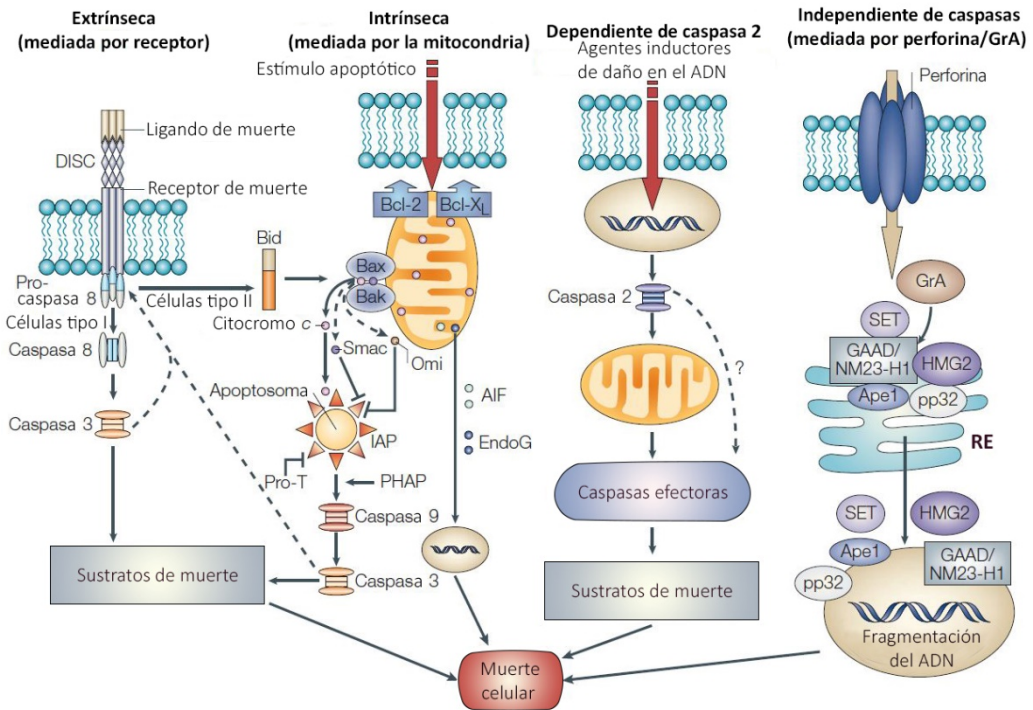


Figura 15. Vías de señalización activadoras de la apoptosis (adaptada de Orrenius, 2003 [130]).

- Apoptosis extrínseca. Está mediada por la activación de receptores de membrana inductores de muerte celular pertenecientes a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Cuando el receptor se activa por la unión de un ligando, se genera el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), el cual escinde la pro-caspasa 8 y, la caspasa 8 activada es capaz de inducir la apoptosis por dos vías.
 - En las células tipo I, la caspasa 8 activa a la caspasa 3, que activa a su vez a las proteínas inductoras de la muerte celular apoptótica.
 - En las células tipo II, la caspasa 8 corta Bid, que induce la traslocación, oligomerización e inserción de Bax y/o Bak en la membrana mitocondrial externa.

A continuación, se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa y se liberan varias proteínas localizadas en el espacio intermembrana mitocondrial, incluyendo el citocromo c, que forma un complejo citosólico con el factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1) y la pro-caspasa 9 en presencia de dATP, conocido como apoptosoma. Esto resulta en la activación de la caspasa 9, que activa a la caspasa 3, efectora de la muerte celular.

- Apoptosis intrínseca. Las señales de muerte funcionan directa o indirectamente sobre la mitocondria, resultando en la formación del apoptosoma, que activa la pro-caspasa 9, y ésta activa a la caspasa 3 efectora de la apoptosis. Esta vía está controlada por la familia de proteínas Bcl-2, que regulan la liberación del citocromo c; las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs), que inhiben a las caspasas; y el segundo activador mitocondrial de las caspasas (Smac) y Omi, que regulan negativamente a las IAPs. La función del apoptosoma también está regulada por la oncoproteína pro-timosina α (Pro-T) y la proteína asociada a HLA-DR (PHAP). La vía intrínseca también se puede activar por mecanismos independientes de caspasas, en los que se produce la traslocación de la mitocondria al núcleo de dos proteínas, el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG), que causan la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN.
- Apoptosis dependiente de la caspasa 2. La activación de la pro-caspasa 2 tras producirse daño en el ADN lleva a la liberación del citocromo c y a la formación del apoptosoma, al igual que ocurre en la vía intrínseca, aunque el mecanismo desencadenante se desconoce.
- Apoptosis independiente de caspasas. Recientemente, se ha descrito una nueva vía independiente de caspasas, que está mediada por la granzima A (GrA). Tras ser transportada al citosol de la célula diana a través de poros mediados por perforina y dependientes de calcio, la GrA activa una vía que se caracteriza por la formación de daños puntuales en el ADN y la aparición de la morfología apoptótica. La endonucleasa implicada en la formación de los daños en el ADN es la desoxirribonucleasa activada por GrA (GAAD), cuya actividad es inhibida por el complejo SET, que se localiza en el retículo endoplasmático (RE). Este complejo contiene un inhibidor de la fosfatasa 2A

(pp32), la proteína de ensamblaje del nucleosoma SET, la proteína 2 del grupo de alta movilidad (HMG2) y la endonucleasa 1 apurínica/apirimidínica (Ape1). En esta vía, GrA corta a SET, HMG2 y Ape1, pero no a pp32, para liberar y activar GAAD, que se trasloca al núcleo e induce la fragmentación del ADN.

- Apoptosis intrínseca mediada por el RE. Tiene lugar tras la alteración de la homeostasis del RE debido a estímulos de estrés que incluyen la excesiva entrada de calcio, el estrés oxidativo y la toxicidad química, que causan la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), reduciéndose la síntesis de proteínas y aumentando la expresión de chaperonas. Esta vía está mediada por la caspasa 12 que, tras su activación, se libera al citosol y activa a la caspasa 9.

1.5.2. Necrosis

La necrosis es un tipo de muerte celular independiente de ATP que tiene lugar cuando la célula recibe un daño extremo (radiación, calor, químicos, hipoxia, ...) y repentino, de modo que la célula es incapaz de responder de forma regulada. Morfológicamente, durante la necrosis las células se hinchan y se van formando poros hasta que, finalmente, la membrana se rompe y se libera el contenido celular, causando daño en los tejidos e iniciándose un proceso inflamatorio [131].

1.5.3. Autofagia

La autofagia es un proceso en el que los componentes celulares son retenidos y degradados en lisosomas, con el objetivo de reciclar y crear nuevas estructuras y orgánulos o bien como fuente de energía. La autofagia puede iniciarse como respuesta a estímulos de estrés (como la falta de nutrientes), a señales presentes durante la diferenciación celular y embriogénesis y a señales liberadas por orgánulos dañados. La autofagia también parece estar relacionada con el sistema inmune innato y adaptativo pudiendo degradar patógenos intracelulares, enviar antígenos hacia células que contengan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II y transportar ácidos nucleicos virales a receptores tipo Toll. La autofagia puede resultar en

la destrucción de la célula y se ha relacionado con la eliminación de células de tejidos senescentes y con la destrucción de lesiones neoplásicas.

Se conocen tres formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia y autofagia selectiva. Durante la macroautofagia se engloban regiones celulares enteras en vesículas de doble membrana conocidas como autofagosomas, que se fusionan con lisosomas para convertirse en autofagolisosomas, que contienen proteasas capaces de degradar todo el contenido. En la microautofagia, los orgánulos interactúan y se fusionan directamente con los lisosomas. La microautofagia es más específica que la macroautofagia y puede ser iniciada por moléculas de señalización presentes en la superficie de orgánulos dañados. En la autofagia selectiva, también conocida como autofagia mediada por chaperonas, se produce la interacción de una chaperona citosólica con un pentapéptido presente en la secuencia de aminoácidos de la proteína a degradar. A continuación, la proteína se une al receptor lisosomal LAMP-2A (proteína 2A de membrana asociada a lisosoma) y es dirigida hacia el interior del lisosoma para su degradación.

En general, para iniciar la autofagia son necesarios el complejo ULK1 y el complejo fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) tipo III, formado por ATG14L, Beclina 1, VSP34 y VSP15, que forman el fagóforo. A continuación, un complejo formado por ATG5, ATG12 y ATG16L junto con la proteína asociada a microtúbulos de cadena ligera 3 (LC3II) estimulan la elongación del fagóforo para la formación del autofagosoma. La proteína p60 se une a las proteínas ubiquitinadas y las dirige hacia el autofagosoma para su degradación. El autofagosoma se fusiona con el lisosoma y se genera la digestión del contenido por enzimas hidrolíticas (**Figura 16**) [131].

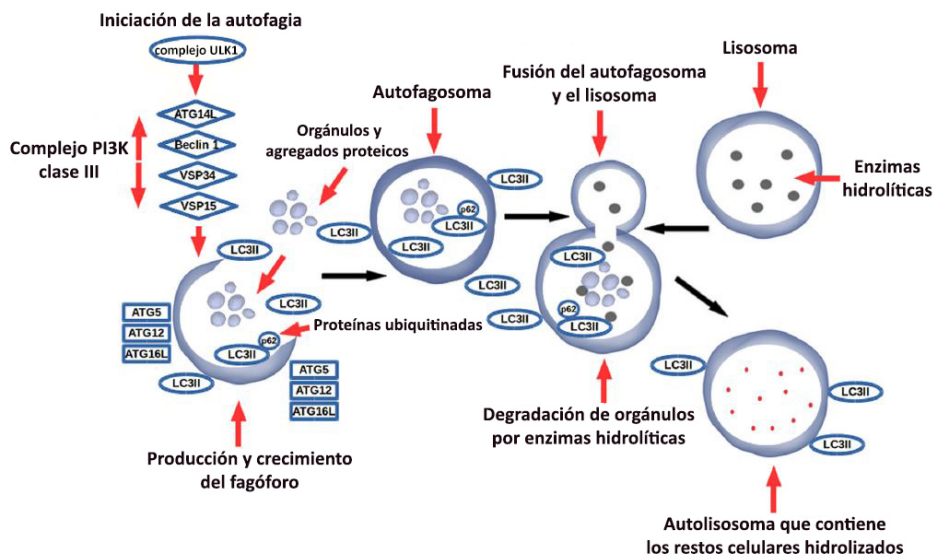


Figura 16. Proceso de autofagia (adaptada de D’Arcy, 2019 [131]).

1.5.4. Otros tipos de muerte celular regulada

- **Necroptosis.** Presenta características de la necrosis, aunque en este caso está regulada por las proteínas de interacción con el receptor RIP1 y RIP3. La activación de la necroptosis está mediada por receptores de muerte celular (TNFR1, TRAIL, Fas). Tras la unión del ligando, se genera el complejo de supervivencia I, formado por la proteína con dominio de muerte asociado al TNFR (TRADD), RIP1 (que se encuentra poliubiquitinado) y varias ligasas E3 de ubiquitina. A continuación, la desubiquitinación de RIP1 induce su propia fosforilación y la de RIP3, con la consecuente oligomerización, formándose el necrosoma. RIP3 recluta a la pseudoquinasa MLKL (del inglés, *mixed lineage kinase domain-like*) y la fosforila en la treonina 357/serina 358, causando su oligomerización y la migración a la membrana celular (**Figura 17**). Esto genera la permeabilización de la membrana plasmática, debido posiblemente a la unión de MLKL con los lípidos fosfatidilinositol y cardiolipina, causando la necrosis de la célula [131].

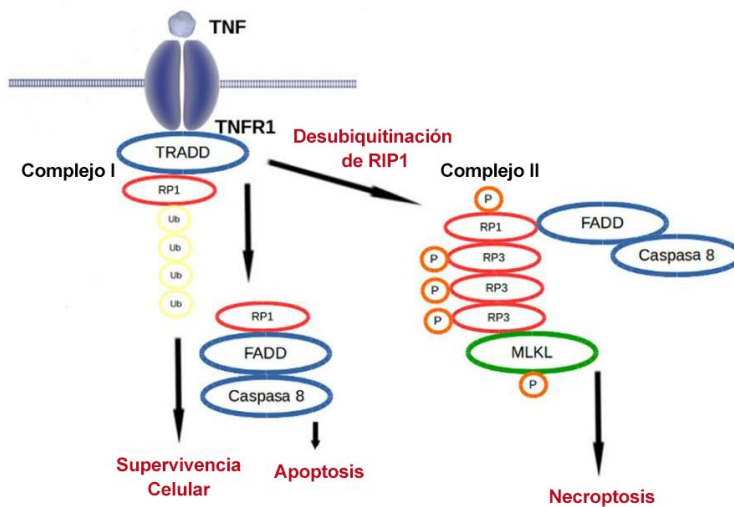


Figura 17. Mecanismo de la muerte celular por necroptosis (adaptado de D’Arcy, 2019 [131]).

- Piroptosis. Se activa por la presencia de bacterias y es un tipo de apoptosis alternativa, dependiente de caspasas, aunque pro-inflamatoria. Tras producirse la infección, se activa la caspasa 1, que genera poros en la membrana plasmática y activa las citoquinas inflamatorias interleucina 1 β (IL-1 β) e IL-18. Debido a los poros, entra agua a la célula, hinchándola y finalmente lisándola, con una liberación concurrente de citoquinas inflamatorias en la región circundante. En la piroptosis, a diferencia de la apoptosis, la integridad nuclear se mantiene, aunque se observa condensación de la cromatina [132].
- Ferroptosis. Es un tipo de muerte celular dependiente de hierro que se caracteriza por la acumulación de peróxidos lipídicos. Morfológicamente, las células ferroptóticas muestran alteraciones mitocondriales, como la disminución o desaparición de las crestas mitocondriales, la ruptura de la membrana mitocondrial externa y la condensación de la membrana mitocondrial interna. La ferroptosis se activa tras la pérdida de actividad de la enzima GPX4, encargada de transformar y eliminar los peróxidos lipídicos [133].
- Necrosis inducida por TPM. Se inicia por alteraciones del microambiente intracelular, como el estrés oxidativo severo y la sobrecarga de calcio en el citosol. Se permeabiliza la membrana mitocondrial interna, causando la rápida pérdida del potencial de

membrana mitocondrial (PMM) y la ruptura osmótica de las membranas mitocondriales, desembocando en la muerte de la célula [134].

- *Parthanatos*. Se inicia tras la hiperactivación de la enzima poli (ADP-Ribosa) polimerasa 1 (PARP-1), implicada en la respuesta a daño en el ADN cuando este aumenta considerablemente como consecuencia principalmente del estrés oxidativo. La hiperactivación de PARP-1, resulta en un aumento en la síntesis y acumulación del polímero PAR que provoca la externalización de la PS y la despolarización de la membrana mitocondrial, y, por otra parte, provoca un colapso energético mediante la depleción de NAD⁺ y ATP. En la mitocondria, el polímero PAR se une a AIF y causa la traslocación de éste hacia el núcleo donde produce una fragmentación del ADN a gran escala y la condensación de la cromatina (**Figura 18**) [135].

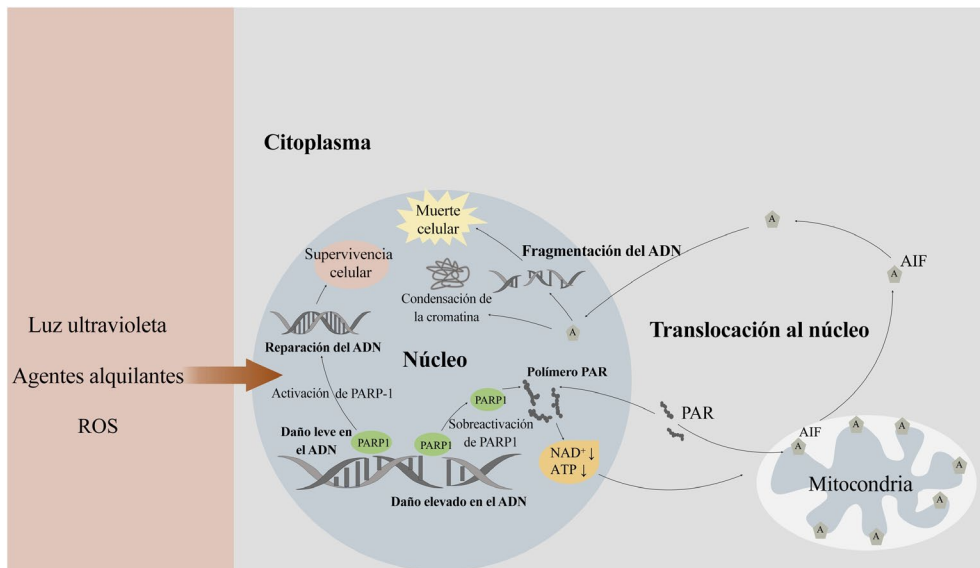


Figura 18. Representación de la muerte celular *parthanatos* (adaptado de Zhou, 2021 [136]).

- Entosis. Es un tipo de canibalismo celular que implica el engullimiento de una célula viable por parte de células no fagocíticas que pueden ser del mismo tipo o de distinto. Suele ocurrir en células tumorales epiteliales en condiciones de proliferación aberrante, falta de glucosa, separación de la matriz o estrés mitótico [129].
- NETosis. Tiene lugar por la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) en respuesta a una infección o daño. Además, promueve la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP), generando un proceso inflamatorio [129].

- Oxeiptosis. Es un nuevo tipo de muerte celular inducido por ROS y mediado por la activación del complejo KEAP1-PGAM5-AIFM1. En condiciones normales, la proteína KEAP1 (proteína 1 asociada al ECH tipo Kelch) se encuentra formando un complejo junto con Nrf2 (factor relacionado con el factor nuclear eritroide 2) y PGAM5 (miembro 5 de la familia fosfoglicerato mutasa). Cuando aumentan los niveles de ROS intracelulares, KEAP1 se oxida y libera a Nrf2, que se trasloca al núcleo donde induce la expresión de factores antioxidantes. Sin embargo, cuando el daño oxidativo es muy grande o se alarga en el tiempo, KEAP1 libera a PGAM5, que se une y defosforila a AIFM1 activando la muerte celular por oxeiptosis (**Figura 19**). Aunque aún se desconoce el papel de AIFM1, se ha demostrado que en este tipo de muerte no se produce su traslocación de la mitocondria al núcleo [137].

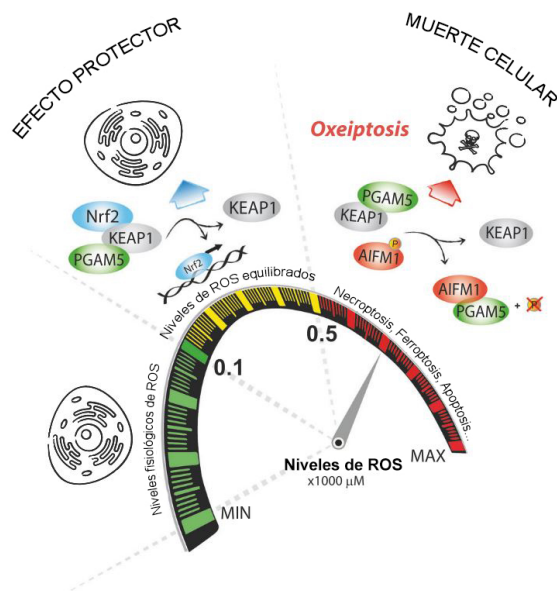


Figura 19. Representación de la muerte celular por oxeiptosis (adaptado de Scaturro, 2018 [137]).

1.6. Ruta de señalización de las MAPKs y su relación con el estrés oxidativo

La ruta de señalización de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) engloba varias cascadas de señalización que regulan procesos fisiológicos como el

crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. Las MAPKs de mamíferos incluyen las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las quinasas C-Jun terminal (JNK) y las MAPK p38. Cada subgrupo de MAPKs se activa mediante una cascada de fosforilación secuencial que se inicia con la activación de las MAPKKK (o MAP3K), que fosforilan y activan a las MAPKK (o MAP2K), y estas a las MAPK (**Figura 20**). La activación de cada uno de los miembros se realiza por la fosforilación dual en los residuos treonina y tirosina pertenecientes a un motivo muy conservado formado por un tripéptido.

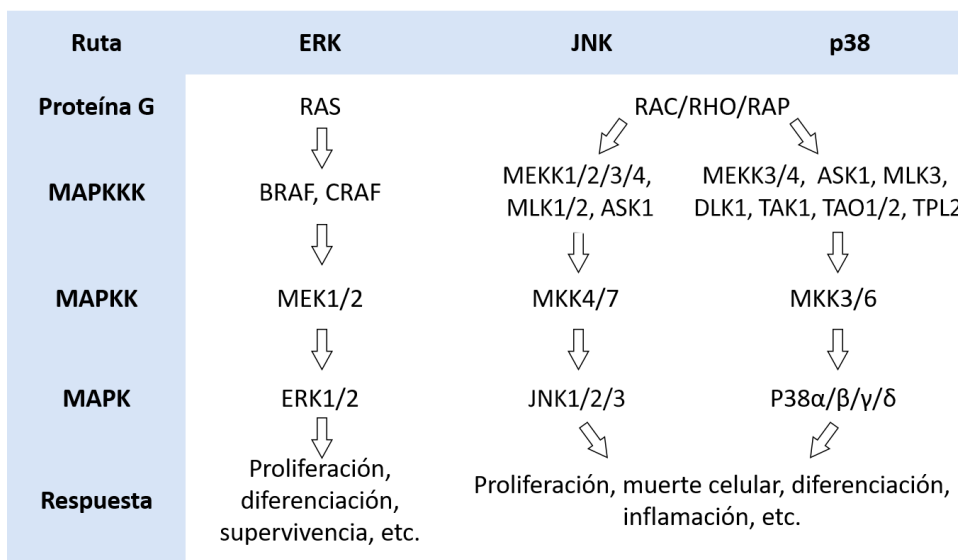


Figura 20. Ruta de transducción de las MAPKs.

La ruta de Ras-Raf-MEK-ERK1/2 es la más comúnmente afectada en cáncer, ya que se encuentra alterada en aproximadamente el 40% de los tumores [138]. Ras es una molécula GTPasa que se activa a través de receptores tirosina-quinasa en respuesta a la unión de factores de crecimiento y mitógenos. En su estado inactivo, Ras se encuentra unida a GDP y, tras recibir un estímulo extracelular, Ras se une a GTP provocando la liberación de un grupo fosfato y transformándolo en GDP, volviendo así a su estado inactivo. Tras su activación, Ras se une a Raf y se traslocan a la membrana plasmática, donde Ras activa la función serina/treonina quinasa de Raf. Entonces, Raf activa a MEK1/2, que catalizan la activación de las quinasas ERK1/2 y su traslocación al núcleo, donde fosforilan varios genes nucleares y citoplasmáticos que participan en la proliferación, supervivencia, diferenciación, motilidad y angiogénesis [138]. Muchas de

las mutaciones observadas en células tumorales se encuentran en los componentes Ras (30%) y Raf (10%), manteniendo la ruta de señalización de ERK constitutivamente activa [138].

Por otro lado, JNK y p38 se activan en respuesta al estrés y están relacionados con la respuesta inflamatoria, el control de la proliferación celular, la supervivencia y la muerte celular. La vía de las JNK puede ser activada por un gran número de citoquinas, ligandos, agentes que interfieren con la síntesis de ADN y proteínas y muchos otros factores de estrés. Todo ello, activaría MEKK1/2/3/4, MLK, o ASK1, que causarían la fosforilación de MKK4/7, que son los responsables de la activación de JNK [139]. Del mismo modo, la ruta de transducción de p38 es comúnmente activada por citoquinas, aunque también por otros estímulos como hormonas, ligandos, receptores acoplados a proteína G, y estrés como el causado por un choque térmico u osmótico. Todo ello podría causar la activación de la vía a través de la fosforilación de ASK1, DLK1, TAK1, TAO1/2, TPL2, MLK3, MEKK3/4 Y ZAK1. Estas activarían a MEK3/6, que podrían fosforilar a los diferentes miembros de la familia de MAPK p38 [139,140].

Está demostrado que las ROS pueden inducir la activación de las rutas de señalización de las MAPKs. Concretamente, el H₂O₂ es capaz de activar las ERK1/2, JNK1/2 y las MAPK p38 [141]. La vía de señalización activada y la respuesta inducida, dependerán del tipo de estrés oxidativo, de la concentración y del tipo celular [142]. Las ROS pueden activar la vía de las MAPKs de forma directa, como resultado de la oxidación de las proteínas implicadas, que puede inducir la activación de las proteínas de señalización (como los receptores tirosina-quinasas o las MAP3K) o la inhibición y degradación de las fosfatasa de MAPKs, causantes de la inactivación de las MAPKs [139]. Sin embargo, la activación de las vías de las MAPKs también se puede producir de forma indirecta, como respuesta a los daños inducidos por las ROS sobre las células. En este caso, las MAPK se activan con el objetivo de dirigir la respuesta frente a los daños causados por el estrés oxidativo y, los componentes activados determinarán si se produce una respuesta protectora (por ejemplo, activando el sistema de reparación de daños en el ADN) o si se induce la apoptosis de la célula.

1.7. Mecanismos de resistencia a fármacos

En la actualidad, los principales problemas de los tratamientos anticancerígenos son: por una parte, la toxicidad y la aparición de efectos adversos debido a su baja especificidad y, por otra parte, la aparición de células resistentes a los fármacos utilizados, que disminuye la eficacia del tratamiento, así como la supervivencia de los pacientes. La heterogeneidad celular, el microambiente del tumor y la presencia de poblaciones de células madre tumorales pueden favorecer el desarrollo de resistencias a fármacos y el mal pronóstico de los pacientes [143].

En primer lugar, la heterogeneidad intratumoral implica la generación de variantes celulares con diferentes propiedades genéticas, epigenéticas, transcriptómicas y proteómicas. Estas variantes celulares van a tener una sensibilidad diferente a los fármacos anticancerígenos, de tal forma que el tratamiento inicial afectaría únicamente a una porción del tumor y, aquellas células tumorales menos sensibles sobrevivirían y proliferarían generando más heterogeneidad [144].

El microambiente del tumor está formado por la matriz extracelular, células inmunes e inflamatorias, vasos sanguíneos, fibroblastos y moléculas de señalización y nutrientes. Otros factores implícitos al microambiente tumoral son el pH ácido, la hipoxia y la señalización e interacción con otras células tumorales y del estroma. Los cambios producidos en el microambiente tumoral tras el tratamiento contribuyen a la adaptación de las células tumorales reduciendo la eficacia e induciendo la resistencia [145].

Finalmente, se sabe que las células madre tumorales presentan múltiples características que las hacen resistentes a los fármacos antitumorales, entre las que podemos destacar la capacidad de eliminación de los fármacos anticancerígenos mediante la sobreexpresión de transportadores de fármacos, la alta tasa de reparación del ADN, la resistencia a la apoptosis y la estabilidad hipóxica [146].

Algunos de los mecanismos por los que las células desarrollan resistencia a ciertos fármacos son: la resistencia a múltiples fármacos (MDR), la inactivación del fármaco o de su diana, la inhibición de la muerte celular, cambios en el metabolismo del fármaco,

cambios epigenéticos y potenciación de los sistemas de reparación del ADN (Figura 21) [143].

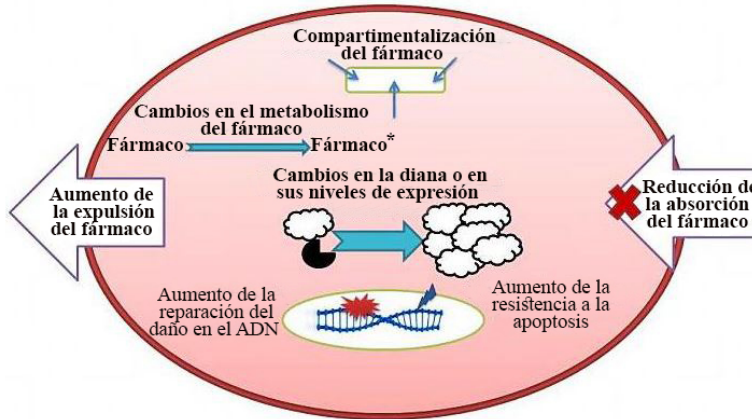


Figura 21. Mecanismos de resistencia a fármacos en las células tumorales (adaptada de Mansoori, 2017 [143]).

- MDR. Es la capacidad de las células tumorales de sobrevivir frente a un amplio rango de fármacos anticancerígenos aumentando la expulsión del fármaco de las células o bien disminuyendo su absorción.

La familia de transportadores de membrana dependientes de ATP (ABC), implicada en el transporte de nutrientes y otras moléculas a través de la membrana plasmática, es la principal familia implicada en la expulsión de fármacos. Los transportadores ABC están formados por dos dominios citoplasmáticos que se unen a ATP y lo hidrolizan, conocidos como ABC (casete de unión a ATP), y dos dominios transmembrana (TMD). La unión e hidrólisis de ATP induce un cambio conformacional en el transportador, que provoca la expulsión de sustratos para evitar la acumulación de sustancias tóxicas en el interior de la célula [147]. Los principales miembros de esta familia de transportadores implicados en la adquisición de MDR son: la glicoproteína P, la proteína 1 asociada a la resistencia de múltiples fármacos (MRP1) y la proteína de resistencia del cáncer de mama (BCRP/ABCG2).

La absorción de fármacos en las células tumorales puede producirse por transferencia pasiva, difusión facilitada o transporte activo. Los transportadores de solutos (SLC) comprenden la principal familia de transportadores implicada en la absorción de

fármacos [148]. Algunos agentes anticancerígenos utilizan transportadores específicos, de modo que mutaciones que causen la inhibición de dichos transportadores, reducirían la absorción de los fármacos.

- Inactivación del fármaco. Existen ciertos fármacos cuya activación depende de su interacción con determinadas proteínas, que pueden modificarlos, degradarlos parcialmente o unirlos a otras moléculas. Sin embargo, las células tumorales pueden desarrollar resistencia a dichos tratamientos disminuyendo su activación. Por ejemplo, el fármaco citarabina en su estado inicial no tiene efecto sobre las células tumorales, sino que necesita ser fosforilado para convertirse en citarabina trifosfato, que es la forma activa [149].

También es posible que las proteínas interactúen con el fármaco para inactivarlo o bloquear el daño producido, ya sea mediante reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis o aumentando su consumo o conversión. Por ejemplo, la familia de proteínas glutatión s-transferasa (GST) constituyen un grupo de enzimas detoxificantes que protegen a las macromoléculas de compuestos electrofílicos. Las GST favorecen el desarrollo de la resistencia a fármacos potenciando la detoxificación e inhibiendo la ruta de señalización de las MAPK [150].

- Inactivación de la diana. Existen terapias dirigidas capaces de bloquear el crecimiento de las células tumorales inhibiendo la actividad de ciertas proteínas implicadas en el desarrollo del tumor. Sin embargo, las células tumorales pueden desarrollar resistencia frente a este tipo de tratamientos modificando su diana mediante mutaciones o alterando los niveles de expresión debido a alteraciones epigenéticas.

Existen muchos fármacos dirigidos frente a quinasas de señalización o sus receptores, lo que en ocasiones ha provocado una resistencia adquirida de las células tumorales causando una sobreactivación o sobreexpresión de dichas quinasas, que implica la activación constitutiva de ciertas rutas de señalización que promueven el crecimiento celular descontrolado. Por ejemplo, algunos inhibidores de tirosina-quinasa del EGFR, como erlotinib y gefitinib, han demostrado una elevada tasa de respuesta tras el

tratamiento inicial. Sin embargo, casi el 50% de los pacientes sensibles acaban desarrollando resistencia frente a los inhibidores de tirosina-quinasa [151].

- Reparación de los daños. Hay muchos tratamientos anticancerígenos que generan daños en el ADN, ya sea directa o indirectamente, y la potenciación de los mecanismos de respuesta a daños en el ADN puede revertir los efectos causados por estos fármacos. Por lo tanto, su eficacia depende del estado de los mecanismos de reparación de daño en el ADN. Así, sería posible aumentar la eficacia de este tipo de tratamientos utilizándolos junto a inhibidores de estas vías de reparación [152].
- Inhibición de la muerte celular. Las células tumorales pueden presentar mutaciones que les permitan evitar diferentes formas de muerte celular promoviendo la progresión y recurrencia del tumor [153].



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

**Cada variable era una posibilidad, cada posibilidad una
incertidumbre, cada incertidumbre una oportunidad.**

AFRICANUS, EL HIJO DEL CÓNSUL.

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral es **evaluar una terapia enzimática basada en el uso de la DAO con nanotecnología como tratamiento anticancerígeno en carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma**. En el trabajo se ha utilizado la enzima DAO de *Rhodotorula gracilis* unida al extremo C-terminal implicado en la unión a colina de la amidasa N-acetilmuramoil-L-alanina (CLyTA) de *Streptococcus pneumoniae*. Para el desarrollo del estudio se han establecido los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto antiproliferativo de CLyTA-DAO, tanto libre como inmovilizada, en líneas celulares de distinto origen.
2. Determinar el tipo de mecanismo de muerte celular inducido por CLyTA-DAO.
3. Caracterizar a nivel molecular las líneas celulares resistentes a la muerte inducida por CLyTA-DAO.
4. Estudiar el efecto producido al combinar CLyTA-DAO con otros tratamientos antitumorales.
5. Evaluar la expresión de los genes implicados en la resistencia a CLyTA-DAO en biopsias de pacientes.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

**Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es
también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas.**

MARIE CURIE.

3.1. Cultivo celular

3.1.1. Líneas celulares

Para determinar la capacidad antiproliferativa de CLyTA-DAO se utilizaron un amplio rango de líneas celulares humanas procedentes de adenocarcinoma de páncreas exocrino, adenocarcinoma colorrectal y glioblastoma, así como líneas celulares no tumorales.

3.1.1.1. Cáncer de páncreas

Las líneas celulares de CP que se muestran a continuación fueron generosamente donadas por el Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM) de Barcelona. En la **Tabla 3** se incluye el origen y el estado mutacional de cada una de las líneas celulares.

Línea celular	Origen	KRAS	TP53	P16	Otros
Hs766T	Adenocarcinoma pancreático derivado de metástasis de nódulo linfático	Gln61His	-	-	Delección SMAD4
IMIM-PC-2	Tumor primario de ADP	Gly12Asp	Arg306Stop	Delección	
RWP-1	Adenocarcinoma pancreático derivado de metástasis de hígado	Gly12Asp	Arg175His	Arg58Stop	

Tabla 3. Líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas exocrino.

3.1.1.2. Cáncer colorrectal

Todas las líneas celulares de CCR fueron donadas por el IMIM, excepto la línea celular HGUE-C-1, que fue establecida a partir de un cultivo primario por nuestro grupo de investigación en el Hospital General Universitario de Elche (HGUE) [154] (**Tabla 4**). De

ellas, se seleccionaron las líneas celulares HT-29, SW-480 y SW-620 para profundizar en el efecto inducido por el tratamiento con CLytA-DAO.

Línea celular	Origen	KRAS	TP53	APC	Otros
HT-29	Adenocarcinoma de colon	-	Arg273His	Gly853Stop	BRAF (Val600Glu) PIK3CA (Pro449Thr) SMAD4 (Gln311 Stop)
SW-480	Adenocarcinoma de colon	Gly12Val	Arg273His	Gln1338Stop	
SW-620	Adenocarcinoma de colon derivado de metástasis de nódulo linfático	Gly12Val	Arg273His	Gln1338Stop	
HGUE-C-1	Adenocarcinoma de colon	-	-	Mut	

Tabla 4. Líneas celulares de carcinoma colorrectal.

3.1.1.3. Glioblastoma multiforme

De glioblastoma multiforme se emplearon tanto líneas celulares comerciales, obtenidas de la ATCC (del inglés, *American Type Culture Collection*) (**Tabla 5**), como líneas celulares procedentes de cultivos primarios establecidos en nuestro laboratorio (HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40, HGUE-GB-42, HGUE-GB-48). Las líneas celulares establecidas en nuestro grupo de investigación no presentan mutación en *IDH* ni en *PTEN*, aunque sí en el promotor de *TERT* y *TP53* [155]. Se seleccionaron las líneas celulares T98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 para profundizar en el efecto inducido por el tratamiento con CLytA-DAO.

Materiales y métodos

Línea celular	IDH	PTEN	TP53	TERT	Otros
T98	wt	Leu42Arg	Met237Ile	-	-
U87	wt	Mut	wt	Mut	NF1Del

Tabla 5. Líneas celulares de glioblastoma.

3.1.1.4. Líneas celulares no tumorales

Se utilizaron células no tumorales de diferente origen para determinar la toxicidad de la DAO (**Tabla 6**).

Línea celular	Origen
Linfocitos	Cultivo primario establecido en el HGUE.
3T3-L1	Adipocitos de ratón cedidos por el grupo de investigación del Dr. Vicente Micol.
1BR3.G	Fibroblastos humanos inmortalizados con SV40, cedidos por el IMIM.
IMR90	Fibroblastos humanos sin inmortalizar, cedidos por el IMIM.
HPDE	Células pancreáticas ductales humanas inmortalizadas con papilomavirus, cedidas por el IMIM.

Tabla 6. Líneas celulares y cultivos primarios de origen no tumoral.

Los cultivos primarios de linfocitos se establecieron a partir de muestras de sangre de análisis rutinarios de pacientes no oncológicos ni infecciosos, gracias a la colaboración de la Unidad de Hematología y con la aprobación del Comité Ético y de Investigación Clínica (CEIC) del HGUE. Las muestras de sangre fueron tratadas con tampón de lisis de eritrocitos (EL, Qiagen) durante 30 minutos a 4°C y, a continuación, centrifugadas a 300 x g durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se descartó el sobrenadante y este proceso se repitió hasta eliminar completamente los eritrocitos de la muestra. Finalmente, el precipitado con los linfocitos fue cultivado tal y como se describe en el siguiente apartado.

3.1.2. Condiciones de cultivo

Para el cultivo de las líneas tumorales de CP, CCR y GBM y las líneas celulares 3T3-L1, 1BR3.G e IMR90 se utilizó DMEM (Dubelcco's Modified Eagle's Medium) rico en glucosa, con glutamina estable y Hepes 25 mM (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos).

Para las líneas celulares de glioblastoma establecidas a partir de cultivos primarios se utilizó DMEM-F12 con glutamina estable y Hepes 15 mM (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos). Los cultivos primarios de linfocitos se mantuvieron en medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos). En los tres casos, el medio fue suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) y 1% (v/v) de una mezcla de los antibióticos penicilina y estreptomina (Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos). Por otra parte, la línea celular HPDE se mantuvo en medio de queratinocitos sin suero (KSF) suplementado con factor de crecimiento epidérmico (5 ng/mL) y extracto de hipófisis bovina (50 mg/mL) (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Todas las líneas celulares se cultivaron en frascos de cultivo celular T25 mantenidos en un incubador (ESCO Celculture® CO₂ incubator, Esco Lifesciences GmbH, Friedberg, Alemania) a 37°C con CO₂ al 5% y atmósfera humidificada.

3.2. Reactivos químicos y tratamientos utilizados

En la **Tabla 7** se indican los diferentes fármacos utilizados en este estudio junto con su función, concentración y la casa comercial de la que se han obtenido.

Todos los inhibidores fueron añadidos 30 minutos antes que el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala y mantenidos hasta el final del mismo, a excepción del BAPTA-AM que se añadió 1 hora antes que el tratamiento con CLyTA-DAO y, pasado este tiempo, se retiró del medio. Para analizar el efecto combinatorio de CLyTA-DAO y D-Ala junto con BCNU o TSA, ambos tratamientos fueron añadidos simultáneamente.

El tratamiento con radioterapia se realizó en la Unidad de Oncología Radioterápica del HGUE. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000-350.000 células por pocillo. Tras 24 horas, los pocillos se cubrieron completamente con tampón fosfato salino (PBS, Biowest®, Riverside, MO, Estados Unidos) y se irradiaron con una dosis de 7 Gy, aplicada con una tasa de 6 Gy/min, en el acelerador lineal de electrones VARIAN 2100C (Varian Medical Systems, Palo Alto, CA,

Estados Unidos). Tras el tratamiento, el PBS se reemplazó por medio fresco y las células se mantuvieron en incubación a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas.

Reactivo	Función	Conc.	Casa comercial
D-Ala	Sustrato DAO	1 mM	Alfa Aesar
Cloruro de colina	Liberación de la DAO de las nanopartículas magnéticas	0,1-100 mM	Acros Organics™ Merck
H ₂ O ₂	Productor de ROS	600 μM	Millipore
EGTA	Quelante de calcio extracelular	100 μM	Sigma Aldrich®
BAPTA-AM	Quelante de calcio intracelular	5 μM	Calbiochem®
Z-VAD-FMK	Inhibidor pan-caspasa	25 μM	Calbiochem®
Cloroquina (CQ)	Inhibidor de la autofagia	10 μM	Sigma Aldrich®
Espautina-1 (Sp-1)	Inhibidor de la autofagia	10 μM	Sigma Aldrich®
Necrostatina-1 (NC-1)	Inhibidor de la necroptosis	20 μM	Sigma Aldrich®
Ferostatina-1 (Fe-1)	Inhibidor de la ferroptosis	10 μM	Sigma Aldrich®
Z-IE(OMe)TD(OMe)-FMK	Inhibidor de la caspasa 8	20 μM	Calbiochem®
Péptido inhibidor de Bax, V5 (BIP-V5)	Inhibidor de Bax	200 μM	Calbiochem®
DPQ	Inhibidor de PARP	10 μM	Calbiochem®
AZD6244	Inhibidor de ERK	1 μM	ChemieTeK
SP600125	Inhibidor de JNK	2,5 μM	Calbiochem®
PD 169316	Inhibidor de p38	10 μM	Calbiochem®
BAY-11-7082	Inhibidor de NF-kB	5 μM	Enzo® Life Sciences
Sorafenib	Inhibidor de BRAF	1 μM	Sigma Aldrich®
Carmustina (BCNU)	Agente alquilante utilizado en quimioterapia	50 μM	Sigma Aldrich®
Tricostatina A (TSA)	Inhibidor de desacetilasas de histonas	0,1 μM	Sigma Aldrich®

Tabla 7. Descripción de los reactivos químicos utilizados.

3.3. Aislamiento de CLyTA-DAO

3.3.1. Transformación bacteriana

La cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) fue transformada mediante un choque térmico con el plásmido pCPC21, que confiere resistencia a ampicilina y codifica la proteína CLyTA-DAO [156]. Para ello, se añadieron 0,5 μL de plásmido a 100 μL de células y se mantuvieron a 4°C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se dejaron 2 minutos a 37°C y, a continuación, de nuevo 5 minutos a 4°C. Para que las células que habían

incorporado el plásmido tuvieron tiempo de expresar el gen de resistencia a ampicilina, se les añadió 1 mL de medio Luria-Bertani (LB, Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Haverhill, MA, Estados Unidos) y se dejaron 1 hora a 37°C. Seguidamente, se sembraron en placas de LB con ampicilina y se guardaron en la estufa a 37°C.

3.3.2. Cultivo bacteriano

Inicialmente, utilizando un raspado de las bacterias transformadas, se realizó un precultivo en 10 mL de medio LB con ampicilina a 1 µg/mL. El precultivo se mantuvo durante toda la noche en un incubador con agitación orbital de 200 rpm a 37°C.

Las bacterias crecidas se pasaron a un frasco que contenía 1 L de medio LB y ampicilina a la misma concentración. El cultivo se mantuvo en el incubador el tiempo necesario para alcanzar la fase exponencial de crecimiento y se le añadió isopropil-β-D-1-tiofalactopiranosido (IPTG, Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a 0,5 mM, que es el sustrato inductor necesario para que las bacterias produzcan la enzima. De nuevo, se dejó el cultivo bacteriano en el incubador durante toda la noche, pero esta vez a 30°C para evitar que la enzima precipitara o se plegara de forma inadecuada.

3.3.3. Extracción de CLytA-DAO

Las bacterias fueron separadas del medio mediante centrifugación a 4.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se resuspendieron en 50 mL de un tampón de fosfato sódico a 20 mM, pH 7,5 con glicerol al 20% y se les añadió el cofactor de la DAO, FAD (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a 100 µM. A continuación, las bacterias se lisaron mediante 10 ciclos de sonicación (Branson sonifier 250, Branson Ultrasonics™, Brookfield, CT, Estados Unidos) y el lisado se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos a 4°C. De este modo, los restos celulares precipitaron y se descartaron, mientras que el sobrenadante con la enzima se purificó.

3.3.4. Purificación de CLytA-DAO

La enzima CLytA-DAO se purificó por afinidad utilizando una columna de DEAE-celulosa equilibrada con un tampón de fosfato sódico al 20 mM, pH 7,5 y 20% de glicerol. Una vez pasado el extracto proteico por la columna, se realizaron varios lavados con un tampón de fosfato sódico 20mM, pH 7,5 con glicerol al 20% y NaCl 1.5 M y, finalmente, para eluir la enzima se utilizó el tampón anterior junto con cloruro de colina al 2% (p/v).

3.3.5. Cuantificación proteica

La concentración de la proteína purificada se calculó a partir de la absorbancia a 280 nm mediante la ley de Lambert-Beer. Para ello, se utilizó el coeficiente de extinción molar teórico ($150.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) obtenido a partir de la secuencia de la proteína con la herramienta *ProtParam* del servidor ExPASy.

3.4. Inmovilización de CLytA-DAO

Para poder inmovilizar la enzima por afinidad, es necesario liberar la colina que queda unida al dominio CLytA durante la purificación. Esto se realizó mediante un proceso de diálisis a 4°C en tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7,5 con 10% de glicerol. Tras la diálisis, se realizó una centrifugación a 15.500 x g durante 3 minutos a 4°C para descartar toda la proteína que hubiera podido precipitar.

Para la inmovilización de la enzima se utilizaron nanopartículas magnéticas (NPM) de 200 nm, formadas por un núcleo de magnetita recubierto por una matriz de almidón funcionalizado con DEAE (fluidMAG-DEAE, Chemicell GmbH, Berlín, Alemania) (**Figura 22**). La inmovilización se realizó incubando 500 µg de enzima por cada 5 mg de nanopartículas durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave. Y, finalmente, con la ayuda de un imán, se hizo un lavado con el mismo tampón utilizado para la diálisis, para descartar la DAO que no se hubiera inmovilizado.

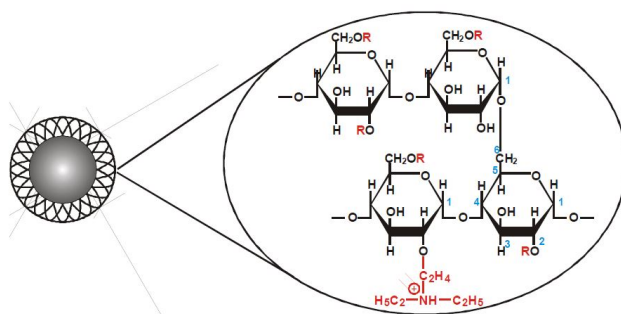


Figura 22. Estructura de las nanopartículas magnéticas fluidMAG-DEAE (fuente: Chemicell).

Para la inmovilización de la enzima en nanopartículas de oro utilizamos las nanopartículas NITgold (Nanoimmunotech, Zaragoza, España) de 30 nm de tamaño y funcionalizadas con PEG para aumentar su estabilidad y evitar la agregación. La inmovilización de la enzima se realizó gracias a la afinidad del oro por el azufre de los grupos tiol presentes en las cisteínas. Para desprotonar el azufre de los grupos tiol, se aumentó el pH de CLyTA-DAO mediante una diálisis utilizando un tampón fosfato sódico 20 mM a pH 8 y con 10% de glicerol. De nuevo, la enzima dializada se centrifugó para descartar toda la proteína que hubiera podido precipitar y, seguidamente, se mezclaron 500 μg de enzima con 500 μl de nanopartículas de oro (equivalentes a 4.25×10^{12}) y se mantuvieron en agitación durante 30 minutos. Para eliminar la enzima no inmovilizada se realizó una nueva centrifugación y el precipitado se resuspendió en 500 μl del tampón utilizado en la diálisis.

La inmovilización de la enzima por atrapamiento en cápsulas de alginato se llevó a cabo mezclando 100 μg de CLyTA-DAO con 1 mL de una disolución de alginato sódico. A continuación, la mezcla se introdujo en una jeringa y se fue añadiendo lentamente sobre una disolución de cloruro cálcico a 50 mM que se encontraba en agitación. Una vez formadas las cápsulas, se separaron del resto de la disolución mediante filtración y se lavaron con un tampón fosfato sódico 50 mM con pH 7.

3.5. Determinación de la actividad enzimática

La actividad de la enzima DAO se determinó a partir de la cuantificación de ácido benzoil-fórmico, producto de la reacción catalizada por la DAO sobre el aminoácido D-fenilglicina (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos). Para la reacción, se incubaron 10 µg de DAO junto con 15 mM de D-fenilglicina durante 10 minutos en agitación. A continuación, la reacción se paró añadiendo 100 µL de ácido acético al 99% y se centrifugó 3 minutos a 15.500 x g para descartar la proteína que hubiera podido precipitar. La cuantificación del producto se determinó mediante espectrofotometría a 252 nm y, a partir de la cantidad de producto, se calculó la actividad de la enzima. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para generar 1 nmol de producto por minuto a 25°C y pH 7,5.

3.6. Estudio de la proliferación celular

La capacidad antiproliferativa de CLyTA-DAO se analizó utilizando el ensayo colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) basado en la reacción de reducción catalizada por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Tras añadir el compuesto MTT de color amarillo, la succinato deshidrogenasa de la células viables cataliza la apertura del anillo de tetrazol, generando sales de formazán ((E,Z)-5-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-difenilformazán), que son insolubles, impermeables a la membrana plasmática y de color morado. De este modo, es posible cuantificar la cantidad de células viables, puesto que es proporcional a la cantidad de formazán generado.

Inicialmente, se sembraron las células en placas de 96 pocillos a una densidad de 3.000-4.000 células por pocillo dependiendo del tamaño y la velocidad de crecimiento de la línea celular. Pasadas 24 horas, se añadieron los tratamientos correspondientes por sextuplicado y se mantuvieron en cultivo 72 horas. En aquellos MTT en los que se redujo el tiempo de tratamiento a 24 horas, la siembra inicial se realizó con 7.000-8.000 células por pocillo. Finalizado el tiempo de tratamiento, se añadió el reactivo MTT (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) a una concentración final de 0,25 mg/mL durante

3 horas. Durante todo el tiempo del ensayo, las células se mantuvieron en un incubador a 37°C con un 5% de CO₂. Finalmente, se retiró el contenido de los pocillos y se añadieron 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y las placas se mantuvieron 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación intensa para disolver los cristales de formazán. Finalmente, se midió la absorbancia de las placas a 570 nm en un lector de placas Gen5™ (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos).

3.7. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular se determinó en función de la integridad de la membrana plasmática, de tal forma que las células con daños en la misma se establecieron como células muertas. Para ello, se utilizó el reactivo de Contaje y Viabilidad de Muse® (*Count & Viability Kit*, Luminex®, Austin, TX, Estados Unidos), que contiene dos marcadores de unión a ADN, uno impermeable a la membrana plasmática y otro permeable. El fluoróforo impermeable se une al ADN de las células muertas, mientras que el permeable, marca los núcleos de todas las células para diferenciar las células nucleadas, vivas o muertas, de los restos celulares (**Figura 23**).

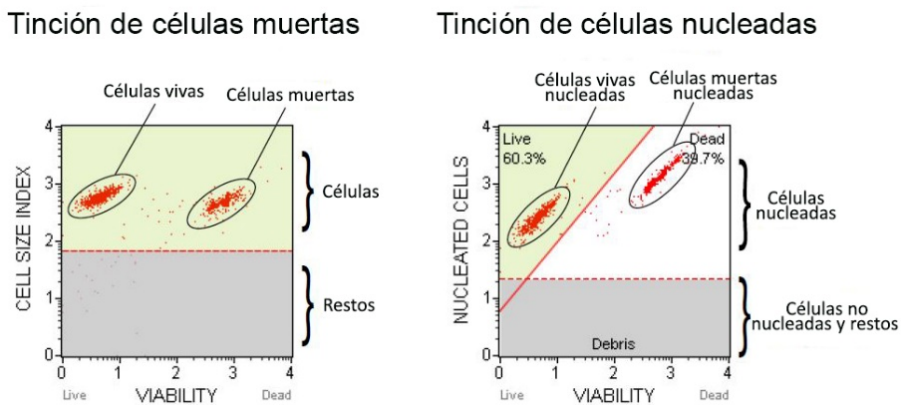


Figura 23. Distribución de las células con el ensayo de Contaje y Viabilidad de Muse® (fuente: Luminex Corporation).

Inicialmente, se sembraron entre 250.000-350.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas en incubación, se les añadió el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en PBS a una concentración final de 1×10^6 células/mL. Finalmente, se mezclaron 50 μ L de suspensión celular con 150 μ L del reactivo de Contaje y Viabilidad, se incubó la mezcla durante 5 minutos en oscuridad y se midió la fluorescencia con el analizador celular Muse[®] (Luminex[®], Austin, TX, Estados Unidos).

3.8. Análisis del ciclo celular

Para determinar el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular se utilizó el marcaje con yoduro de propidio, un compuesto fluorescente impermeable a la membrana plasmática que se intercala en el material genético de las células. El yoduro de propidio tiene un pico de excitación a 535 nm (azul-verde) y su máximo de emisión se produce a 617 nm (rojo).

El ciclo celular se divide en cuatro fases: G₁, S, G₂ y M. Durante la fase G₁ las células crecen, sintetizan proteínas y ARN y aumenta el número de ciertas estructuras citoplasmáticas y orgánulos, en la fase S se produce la replicación del ADN, en la fase G₂ las células continúan creciendo y produciendo las proteínas necesarias para la división celular y, la fase M se corresponde con la mitosis o división de las células. La fase G₁ es la de mayor duración de modo que en su estado normal, la mayoría de las células se encuentran en esta fase. Una vez eliminado el ARN con ribonucleasa (RNasa), es posible diferenciar entre las fases del ciclo celular según su contenido de ADN, ya que las células que se encuentran en fase G₂ o M presentan el doble de contenido de ADN que las que se encuentran en fase G₁. El marcaje de las células con yoduro de propidio y el posterior análisis mediante citometría de flujo, permite diferenciar entre las distintas fases del ciclo celular en función de la intensidad de fluorescencia. Con este tipo de ensayo es posible detectar las células muertas, ya sea por apoptosis o necrosis, puesto que su ADN se encuentra fragmentado, por lo que la intensidad de fluorescencia es inferior a la observada en las células vivas, esto se conoce como la fase SubG₁ (**Figura 24**). Por lo tanto,

mediante el análisis del ciclo celular podemos determinar no sólo si el tratamiento tiene efecto sobre las células, sino también es posible diferenciar si dicho efecto es citotóxico (muerte celular) o citostático (bloqueo del ciclo celular en alguna de las fases).

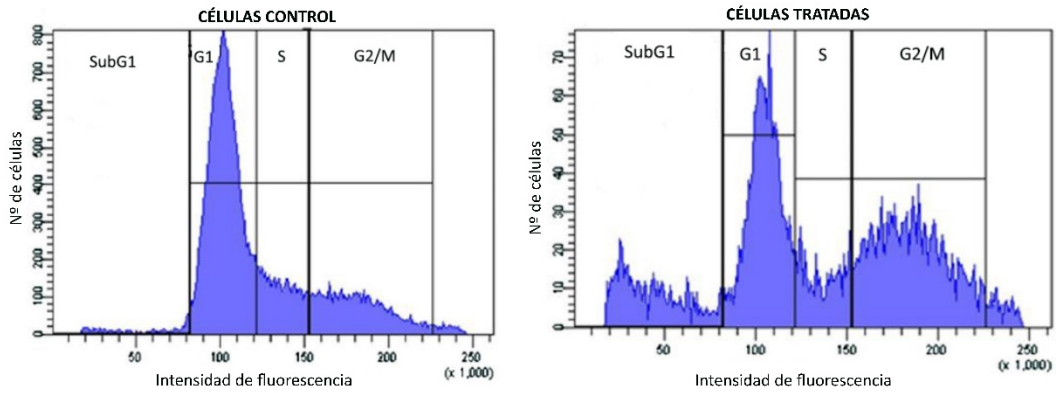


Figura 24. Análisis de la distribución de las células en las fases del ciclo celular observada con el marcaje de yoduro de propidio (adaptada de Al-Malky, 2019 [157]).

Para realizar este tipo de estudio, se sembraron entre 250.000-350.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas de incubación, se les añadió el tratamiento correspondiente, que se mantuvo durante un tiempo mínimo de 24 horas que es aproximadamente lo que dura el ciclo celular en los mamíferos. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos, se resuspendieron en 1 mL de etanol frío al 75% y se incubaron a -20°C durante un mínimo de 1 hora para fijarlas. A continuación, se retiró el etanol mediante otra centrifugación de 5 minutos a 400 x g y las células se resuspendieron en 500 µL de una disolución de PBS que incluye Tritón X-100 al 0,5% (v/v) (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) para permeabilizar la membrana plasmática, 25 µg/mL de RNasa A (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) para eliminar el ARN, y 25 µg/mL de yoduro de propidio (Promocell®, Heidelberg, Alemania). Finalmente, tras 30 minutos de incubación en oscuridad, se realizó el análisis del ciclo celular con el citómetro de flujo BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, San José, CA, Estados Unidos).

3.9. Cuantificación de especies reactivas de oxígeno

El compuesto 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH₂-DA) es una sonda permeable a la membrana plasmática, que no es fluorescente en su estado basal. Una vez en el interior celular, las esterasas celulares lo desacetilan transformándolo en 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH₂), que ya no es permeable a la membrana plasmática y, al entrar en contacto con las ROS intracelulares, se oxida convirtiéndose en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que sí es fluorescente (**Figura 25**). El rango de excitación de la DCF se encuentra entre 480-500 nm (azul) y emite fluorescencia a 515-530 nm (verde-amarillo).

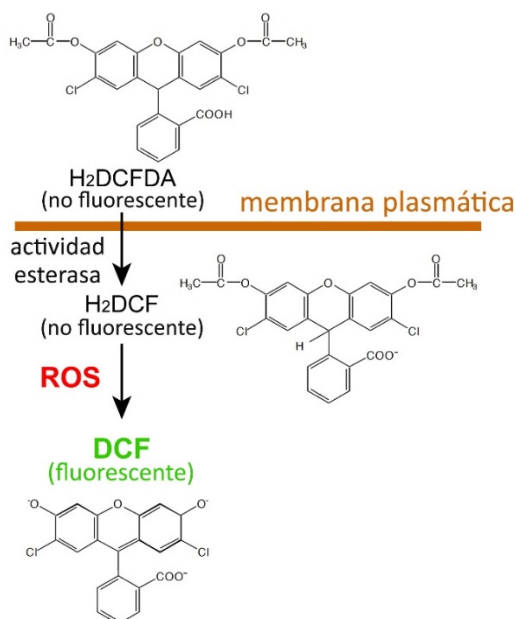


Figura 25. Transformación de la sonda DCFH₂-DA no fluorescente en DCF fluorescente por las ROS intracelulares (adaptada de Yoon, 2018 [158]).

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con paredes negras y con fondo transparente a una densidad de 15.000-20.000 células por pocillo. Tras 24 horas, se añadió el tratamiento correspondiente junto con 10 µg/mL de DCFH₂-DA (Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) y las células se mantuvieron en incubación durante diferentes tiempos en un rango de 20 minutos a 2 horas. Cada una de las condiciones de tratamiento se realizó por sextuplicado y los diferentes tiempos tuvieron un control que

contenía únicamente la sonda. Tras finalizar el tiempo de tratamiento, se retiró el contenido de los pocillos, se hizo un lavado con PBS y se midió la fluorescencia en un lector de placas POLARstar Omega (BMG LabTech, Ortenberg, Alemania).

3.10. Análisis del daño en el ADN a través de la histona H2A.X

H2A.X es un miembro de la familia de histonas H2A, que se fosforila en la serina 139 cuando se producen daños en el ADN. Esta fosforilación es responsable de la activación de proteínas de respuesta a dicho daño y participa en su reparación. Puesto que los niveles de fosforilación de la histona H2A.X, aumentan proporcionalmente con el daño en el ADN, se puede utilizar como un marcador del mismo.

El Kit de detección dual de la activación de H2A.X de Muse® (*H2A.X Activation Dual Detection Kit*, Luminex®, Austin, TX, Estados Unidos) contiene dos anticuerpos conjugados, uno específico frente a la serina 139 fosforilada de la histona H2A.X unido a la sonda Alexa Fluor®555 (Ex. Máx. 555 nm/Em. Máx. 580 nm, fluorescencia naranja) y otro frente a la histona H2A.X unido al fluoróforo PECy5 (Ex. Máx. 496 nm/Em. Máx. 667 nm, fluorescencia roja) para medir los niveles totales de histona y poder así normalizar el resultado.

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 250.000-350.000 células por pocillo y, tras 24 horas en incubación, se les añadió el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se procedió según las instrucciones especificadas por el fabricante. Las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos, se resuspendieron en una mezcla que contenía 0,5 mL de tampón de ensayo junto con 0,5 mL de tampón de fijación y se incubaron 5 minutos a 4°C. Una vez fijadas, se centrifugaron de nuevo para eliminar el tampón, se resuspendieron en 1 mL de tampón de permeabilización frío y se mantuvieron 5 minutos a 4°C. Las células fijadas y con la membrana plasmática permeabilizada, volvieron a centrifugarse y esta vez se resuspendieron en 450 µL de tampón de ensayo. A continuación, se hicieron alícuotas de 90 µL, que equivaldrían a unas 200.000 células, y se les añadieron 10 µL de una solución que contenía ambos anticuerpos en la misma

proporción. Las células se incubaron con los anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad y a temperatura ambiente. Seguidamente, para retirar los anticuerpos, se añadieron 100 μL de tampón de ensayo, se centrifugó de nuevo y, el precipitado se resuspendió en 200 μL de tampón de ensayo para, finalmente, medir el resultado con el analizador celular Muse®.

3.11. Evaluación de la integridad de la membrana plasmática

La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima que se encuentra en el citoplasma de todos los tipos celulares. Esta enzima se puede utilizar para cuantificar la citotoxicidad de un fármaco o su capacidad para alterar la membrana plasmática, ya que cuando se produce la rotura de la membrana plasmática, la LDH es liberada al exterior de la célula. De este modo, la actividad enzimática en el sobrenadante celular es proporcional a la cantidad de células lisadas.

El Kit de Detección de Citotoxicidad (LDH) (Roche®, Basilea, Suiza) es un ensayo enzimático que tiene lugar en dos pasos. Primero, la LDH oxida el lactato convirtiéndolo en piruvato y durante la reacción se reduce NAD^+ , liberándose NADH y H^+ . A continuación, se añade un catalizador, la diaforasa, y la sal de tetrazolio INT (cloruro de 2-(4-yodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio). Con la ayuda de la diaforasa se transfieren los dos hidrógenos liberados en la primera reacción a la sal de tetrazolio (de color amarillo), transformándola en una sal de formazán (de color rojo) (**Figura 26**).

Para realizar este ensayo, se sembraron entre 7.000-8.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos y, tras 24 horas, se añadió el tratamiento por sextuplicado. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, se añadieron 100 μL por pocillo de la mezcla de reacción, que contiene la diaforasa, el NAD^+ , el lactato de sodio y el INT, y las células se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. A continuación, se añadieron 50 μL por pocillo de solución de parada y se midió la absorbancia a 492 nm, utilizando la absorbancia a 690 nm como referencia, con el lector de placas Gen5™.

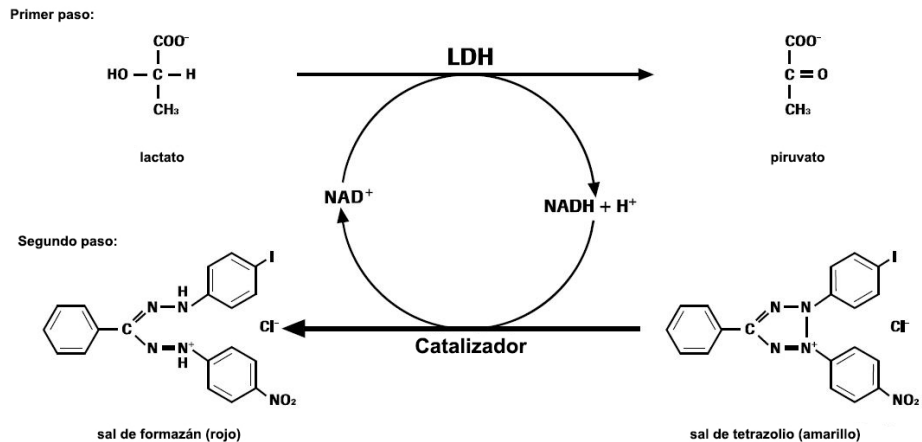


Figura 26. Reacciones enzimáticas catalizadas en el ensayo de citotoxicidad de la LDH (fuente: Roche Applied Science).

3.12. Estudio del Potencial de Membrana Mitocondrial

Para estudiar la despolarización de la membrana mitocondrial se utilizaron dos sondas fluorescentes: MitoTracker™ Red CMXRos y Mitotracker™ Green FM (Invitrogen™, Waltham, MA, Estados Unidos). La sonda MitoTracker™ Red CMXRos tiene una excitación máxima a 579 nm (amarillo) y una emisión máxima a 599 nm (naranja) y es capaz de marcar las mitocondrias de las células vivas que mantienen el PMM. Por su parte, la sonda Mitotracker™ Green FM tiene una excitación máxima a 490 nm (azul) y una emisión máxima a 516 nm (verde) y marca todas las mitocondrias independientemente del PMM.

Para realizar el ensayo, las células se sembraron en placas de 96 pocillos de paredes negras y con fondo transparente a una densidad de 15.000-20.000 células por pocillo. Tras 24 horas, se añadió el tratamiento correspondiente por sextuplicado y las células se mantuvieron en incubación durante diferentes tiempos en un rango de 1 a 6 horas. Tras finalizar el tiempo de tratamiento, se retiró el contenido de los pocillos, y las células se incubaron 30 minutos más, en oscuridad a 37°C y con un 5% de CO₂, con 100 µL por pocillo de medio junto con ambas sondas a una concentración final de 200 nM. Finalmente, se realizó un lavado con PBS y se midió la fluorescencia en el lector de placas Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTeK®, Winooski, VT, Estados Unidos).

3.13. Estudio de la externalización de fosfatidilserina

Una de las principales características de la muerte celular apoptótica es la externalización de la PS, un fosfolípido que normalmente se encuentra en la parte interna de la membrana plasmática. Sin embargo, durante la apoptosis se trasloca hacia la parte externa, actuando como un marcador que facilita la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por parte de los macrófagos.

El Kit de Anexina V y muerte celular de Muse® (Annexin V & Dead Cell Kit, Luminex®, Austin, TX, Estados Unidos) utiliza un doble marcaje con anexina V unida a un fluoróforo y 7-AAD. La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, que presenta alta afinidad por la PS. El 7-AAD es un compuesto fluorescente impermeable a la membrana plasmática con alta afinidad por el ADN. Este doble marcaje nos permite diferenciar entre aquellas células que están iniciando un proceso apoptótico y han externalizado la PS y, aquellas en las que se ha perdido la integridad de la membrana plasmática, debido a que se encuentran en una fase tardía de la apoptosis, o han muerto por necrosis. Como se muestra en la **Figura 27**, en este estudio las células se dividen en cuatro cuadrantes:

- Anexina V (-) y 7-AAD (-): células vivas
- Anexina V (+) y 7-AAD (-): células en apoptosis temprana
- Anexina V (+) y 7-AAD (+): células en apoptosis tardía o necrosis
- Anexina V (-) y 7-AAD (+): restos nucleares

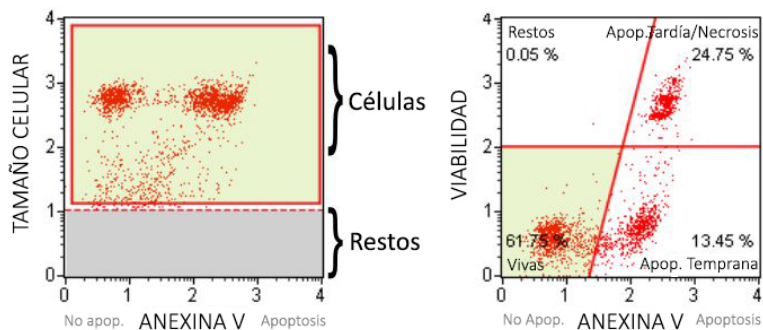


Figura 27. Distribución de las células marcadas con Anexina V y 7-AAD (fuente: Luminex Corporation).

Para este ensayo, se sembraron entre 250.000-350.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y, tras 24 horas en incubación, se les añadió el tratamiento correspondiente. Una vez finalizado el tiempo de tratamiento, las células se tripsinizaron, se centrifugaron a 400 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 1 mL de medio fresco. A continuación, se mezclaron 100 µL de la suspensión celular con 100 µL del reactivo Annexin V & Dead Cell y se incubó 20 minutos en oscuridad a temperatura ambiente antes de medir la fluorescencia con el analizador celular Muse®.

3.14. Transfección con siRNA

Para evaluar el papel de ciertos genes en la sensibilidad y resistencia a los efectos inducidos por el tratamiento con CLytA-DAO se utilizaron siRNA, pequeñas moléculas de ARN de doble cadena de unos 20-30 nucleótidos, que bloquean la expresión de los genes a los que van dirigidos.

Los siRNA pueden ser sintetizados artificialmente, aunque también se producen biológicamente a partir de moléculas de ARN largo de doble cadena, mediante la acción de una RNasa conocida como Dicer. Una vez localizado en el citoplasma celular, el siRNA se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, *RNA-induced silencing complex*). Tras la unión, las dos cadenas del siRNA se separan y la más estable se integra en el complejo RISC, mientras que la otra es degradada. A continuación, la cadena de siRNA dirige al complejo RISC hacia el ARNm de secuencia complementaria, se une a él y la RNasa del complejo, un miembro de la familia de proteínas argonauta (Ago2), lo corta, de forma que la célula lo detecta como un agente extraño y lo degrada. De este modo, el siRNA provoca la degradación de los ARNm a los que va dirigido, impidiendo su traducción a proteínas o lo que es lo mismo, silenciando el gen (**Figura 28**).

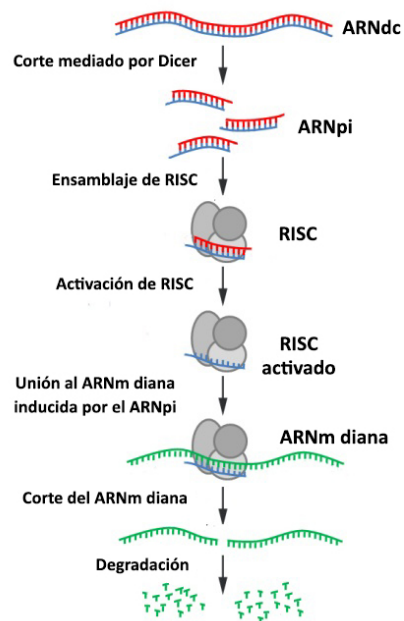


Figura 28. Formación de siRNA y procedimiento para el silenciamiento génico (adaptada de Petrova, 2013 [159]).

Para llevar a cabo la transfección del siRNA se utilizó lipofectamina, un liposoma catiónico capaz de formar complejo con las moléculas de ARN, cargadas negativamente. Los liposomas cargados positivamente en su superficie, con el siRNA en su interior, se fusionan con la membrana plasmática, liberando el siRNA al citoplasma celular.

Para los estudios de silenciamiento génico, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 110.000-125.000 células por pocillo y, tras 24 horas en incubación, se realizó la transfección. Antes de empezar, se retiró el medio de las placas y se sustituyó por DMEM o DMEM-F12 fresco, suplementado con FBS al 10% pero sin antibióticos. No es recomendable realizar la transfección en presencia de antibióticos, puesto que la lipofectamina va a permeabilizar la membrana plasmática, lo que podría incrementar la cantidad de antibióticos en el interior celular, pudiendo alcanzar concentraciones citotóxicas. A continuación, se realizaron dos disoluciones en medio de suero reducido OPTI-MEM® (Gibco™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos), una con 50 pmol/mL del siRNA (Ambion® Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) correspondiente y otra con 20 µL/mL del reactivo Lipofectamine®

RNAiMAX (Invitrogen™, Waltham, MA, Estados Unidos). Ambas disoluciones se agitaron y se mantuvieron en incubación 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las dos disoluciones se mezclaron y se incubó durante 20 minutos más, para dar tiempo a la formación del complejo liposoma-siRNA. Finalmente, se añadió la mezcla a los pocillos correspondientes quedando a una concentración final de 5 pmol/mL de siRNA y de 2 µL/mL de lipofectamina por pocillo. Por cada pocillo transfectado, se añadió un control negativo transfectado mediante el mismo procedimiento, pero utilizando un siRNA no específico.

Las células transfectadas se incubaron durante 48 horas a 37°C con un 5% de CO₂, para asegurar el silenciamiento génico y, a continuación, el medio fue reemplazado por medio fresco, suplementado con FBS y antibióticos, antes de recibir el tratamiento correspondiente. Para este tipo de ensayo, todas las condiciones se añadieron por duplicado y, una vez finalizado el tratamiento, se extrajo ARN de la mitad de los pocillos para comprobar que se había logrado bloquear la expresión del gen (**apartado 3.15.**) y, la otra mitad de los pocillos fueron empleados para estudiar la variación del efecto del tratamiento al silenciar el gen ya fuera mediante análisis de viabilidad (**apartado 3.7.**) o distribución del ciclo celular (**apartado 3.8.**).

3.15. Análisis de expresión génica

Los análisis de expresión génica se realizaron tanto para comprobar la efectividad de la transfección con siRNA como para estudiar la variación en la expresión de determinados genes entre diferentes líneas celulares. El procedimiento general para este tipo de estudio consiste en la extracción del ARN, seguido de la transcripción reversa para obtener ADN complementario (ADNc) y, finalmente, el análisis mediante la reacción en cadena polimerasa (PCR) cuantitativa a tiempo real (q-PCR) empleando sondas fluorescentes específicas para el gen que queremos estudiar.

3.15.1. Extracción de ARN total

3.15.1.1 Líneas celulares

Para purificar el ARN total de las líneas celulares se utilizó el Kit NZY de aislamiento de ARN total (*Nzy Total RNA Isolation kit*, NZYtech, Lisboa, Portugal) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Para estudiar la expresión génica basal o su variación tras el tratamiento con CLytA-DAO, se sembraron entre 350.000-400.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se dejaron en incubación durante 24 horas. A continuación, se trataron las células o no, según el experimento, y se lisaron. Para ello, se retiró el medio y se añadieron 350 μ L de una mezcla que contenía tampón NR y β -mercaptoetanol (β -ME) a una dilución 1:100. El tampón NR contiene tiocianato de guanidina, un agente caotrópico, que además de romper los orgánulos y permeabilizar la membrana plasmática, es capaz de desnaturalizar proteínas, inactivando las RNAsas celulares para asegurar la obtención de las moléculas de ARN intactas. El β -ME es un agente reductor que actúa rompiendo los puentes disulfuro de las proteínas y, por lo tanto, se añade para potenciar la degradación de las RNAsas.

Tras añadir la mezcla de lisis al pocillo, se agitó suavemente y el lisado celular se pasó por una columna NZYSpin de homogenización. Para que el lisado atravesara la columna, se centrifugó durante 1 minuto a 11.000 x g y, seguidamente, al sobrenadante se le añadieron 350 μ L de etanol al 70% y la mezcla resultante se homogenizó con la pipeta. El etanol facilita que los ácidos nucleicos se unan a la membrana de sílice de la columna NZYSpin de unión. Para que la mezcla atravesara la columna, se centrifugó de nuevo 30 segundos a 11.000 x g y, de este modo, el ARN y el ADN se unieron a la membrana de la columna, mientras que el resto de los componentes celulares se eluyeron en el sobrenadante. A continuación, se realizó un lavado con 350 μ L de tampón NI que fue eluido de nuevo mediante centrifugación.

El siguiente paso fue eliminar el ADN de la membrana, para ello se añadieron 95 μ L de una mezcla de digestión compuesta por tampón de digestión y desoxirribonucleasa (DNasa) (1:10) y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente.

Seguidamente, se realizaron varios lavados en las siguientes condiciones: 200 μL de tampón NWR1, 600 μL de tampón NWR2 y 250 μL de tampón NWR2, todos ellos acompañados por una centrifugación para facilitar que atravesaran la membrana de la columna. Finalmente, se realizó una centrifugación durante 1 minuto a 11.000 x g sin ningún tampón para secar la membrana de sílice y se eluyó el ARN añadiendo 40 μL de agua libre de nucleasas y centrifugando en las mismas condiciones.

3.15.1.2. Biopsias de tejido

Las muestras de tejido incluidas en este estudio fueron proporcionadas por el Biobanco HGUA, integrado en la Red Nacional de Biobancos y en la Red Valenciana de Biobancos, con la aprobación de sendos Comités Ético y Científico, y fueron procesadas siguiendo procedimientos normalizados.

La mayoría de las biopsias se obtuvieron a partir de tejido congelado en medio OCT (*Optimal Cutting Temperature*), ya que normalmente la calidad y cantidad de los ácidos nucleicos extraídos es mayor en comparación con la del tejido fijado. Sin embargo, por falta de material, el estudio se completó con algunas muestras de tejido parafinado.

Para la extracción de ARN de tejido congelado se utilizó el RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para obtener la máxima cantidad de ARN posible se utilizaron muestras de entre 20 y 30 mg de tejido. Inicialmente, se retiró el medio OCT y el tejido fue troceado manualmente y posteriormente homogeneizado en una mezcla de lisis que contenía 600 μL de tampón RLT Plus con β -ME (1:100). Con el fin de lograr la degradación completa del tejido, se agitó vigorosamente con una pipeta y, en aquellas muestras en las que había demasiada cantidad de tejido, la degradación se completó mediante sonicación. A continuación, las muestras se centrifugaron 3 minutos a máxima velocidad (16.100 x g) para eliminar cualquier residuo de tejido sólido y el sobrenadante se transfirió a una columna destinada a eliminar el ADN (*gDNA Eliminator spin column*). La columna se centrifugó durante 30 segundos a 8.000 x g y el sobrenadante se mezcló con 600 μL de etanol al 70%. Seguidamente, la muestra se pasó por una columna RNeasy mediante 15 segundos de centrifugación a 8.000 x g. Tras este paso, el ARN se encontraba unido a la membrana de

la columna, por lo que el sobrenadante se descartó y se realizó la siguiente secuencia de lavados: un lavado con 700 μL de tampón RW1 y dos lavados consecutivos con 500 μL de tampón RPE. Finalmente, se eliminó cualquier resto de etanol de la membrana secándola mediante una centrifugación de 1 minuto a máxima velocidad y el ARN se eluyó añadiendo 40 μL de agua libre de nucleasas y centrifugando 1 minuto a 8.000 x g. El sobrenadante se pasó de nuevo por la columna una última vez para aumentar la eficiencia de la extracción.

Para la extracción de ARN de las muestras fijadas en parafina se empleó el kit RNeasy® FFPE (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. La parafina se disolvió añadiendo 600 μL de aceite mineral, se incubó durante 2 minutos a 95°C, se centrifugaron las muestras 3 minutos a 15.000 x g y se retiró la máxima cantidad posible de la mezcla aceite-parafina. En ocasiones, al alcanzar la temperatura ambiente parte del contenido solidifica y no era posible retirar toda la parafina. En estos casos, este paso fue repetido tantas veces como fuera necesario, añadiendo 350 μL de aceite mineral, hasta eliminar toda la cantidad posible de parafina. A continuación, al tejido desparafinado se le añadieron 140 μL de tampón PKD y 20 μL de proteinasa K, se mezcló bien y se incubó durante toda la noche a 56°C en agitación y, posteriormente, 15 minutos más a 80°C para lisar la muestra. La muestra lisada se enfrió manteniéndola 3 minutos a 4°C y se centrifugó 15 minutos a 20.000 x g para eliminar los restos de tejido. Para eliminar el ADN, el sobrenadante se trató con 10 μL de DNasa I junto con 16 μL de un tampón potenciador de la DNasa, se mezcló bien y se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se añadieron 320 μL de tampón RBC y 720 μL de etanol puro y se mezclaron bien para facilitar la unión del ARN a la membrana de sílice. La mezcla anterior se pasó por una columna RNeasy MinElute mediante centrifugación a 8.000 x g durante 15 s, repitiendo este paso las veces necesarias para pasar todo el contenido. Una vez el ARN se unió a la columna, se realizaron dos lavados con 500 μL de RPE centrifugando a 8.000 x g durante 15 s, se secó la columna para eliminar todo el etanol posible centrifugándola a máxima velocidad durante 5 minutos y, finalmente, el ARN se eluyó añadiendo 20 μL de agua libre de nucleasas y centrifugando 1 minuto a máxima velocidad.

3.15.2. Transcripción reversa

El ARN extraído mediante cualquiera de los métodos explicados anteriormente se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm, determinando su pureza mediante los cocientes de absorbancia 260/280 nm y 260/230 nm. Ambas medidas se obtuvieron con el espectrofotómetro Nanodrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos). Se utilizaron únicamente las muestras de ARN que superaban los 50 ng/μL y con unos cocientes de pureza entre 1.8-2.2, el resto fueron descartadas.

Para llevar a cabo la retrotranscripción (RT) de las muestras, se utilizó el Kit de Transcripción Reversa de ADNc de alta capacidad (*High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*, Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Para cada muestra, se utilizó 1 μg de ARN y se le añadieron 6.8 μL de una mezcla que contenía: 2 μL de tampón de RT, 2 μL de cebadores aleatorios, 0.8 μL de una mezcla de dNTP, 1 μL de inhibidor de RNasas y 1 μL de transcriptasa reversa; y a cada muestra se le añadió agua libre de nucleasas hasta alcanzar 20 μL de volumen final. Una vez preparadas las muestras, se introdujeron en el termociclador GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) y se incubaron con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C para el alineamiento de los cebadores con el ARN, seguido de 2 horas a 37°C, que es la temperatura de activación de la retrotranscriptasa, 5 minutos a 85°C para inactivar la retrotranscriptasa y desnaturalizar los cebadores y, finalmente se añadió una temperatura de almacenamiento a 4°C. El ADNc obtenido, se cuantificó con el Nanodrop™ 1000 y se diluyó con agua libre de nucleasas hasta tener una concentración final de 200 ng/μL.

3.15.3. q-PCR

El ensayo de q-PCR permite cuantificar la expresión de un gen, a través de los niveles de ARNm extraídos y retrotranscritos, empleando sondas fluorescentes. De este modo, los niveles de fluorescencia son proporcionales al número de moléculas de ADN amplificadas.

Existen dos tipos de sondas fluorescentes: no específicas (ej. SYBR Green) y específicas (ej. Las sondas Taqman®). Las sondas fluorescentes no específicas se unen a todas las moléculas de ADN de doble cadena, de modo que conforme se va amplificando el gen diana por la acción de la polimerasa, va aumentando la intensidad de la fluorescencia. Las sondas Taqman, en cambio, son más sensibles y específicas. Un ensayo Taqman contiene un par de cebadores de PCR y una sonda Taqman, formada por un oligonucleótido específico frente al gen que queremos estudiar, que contiene un fluoróforo en el extremo 5' y un atenuante de la fluorescencia (*quencher*) en el extremo 3'. Una vez se inicia el proceso de q-PCR, la sonda se une a la secuencia de ADN del gen que queremos estudiar, aunque en estas condiciones la fluorescencia emitida por el fluoróforo es absorbida por el *quencher*. La polimerasa empieza a amplificar el ADN a partir de los cebadores y, al alcanzar la sonda, la hidrolizará gracias a su actividad endonucleasa, liberando al *quencher* y emitiendo la fluorescencia que será detectada por el instrumento de q-PCR (**Figura 29**).

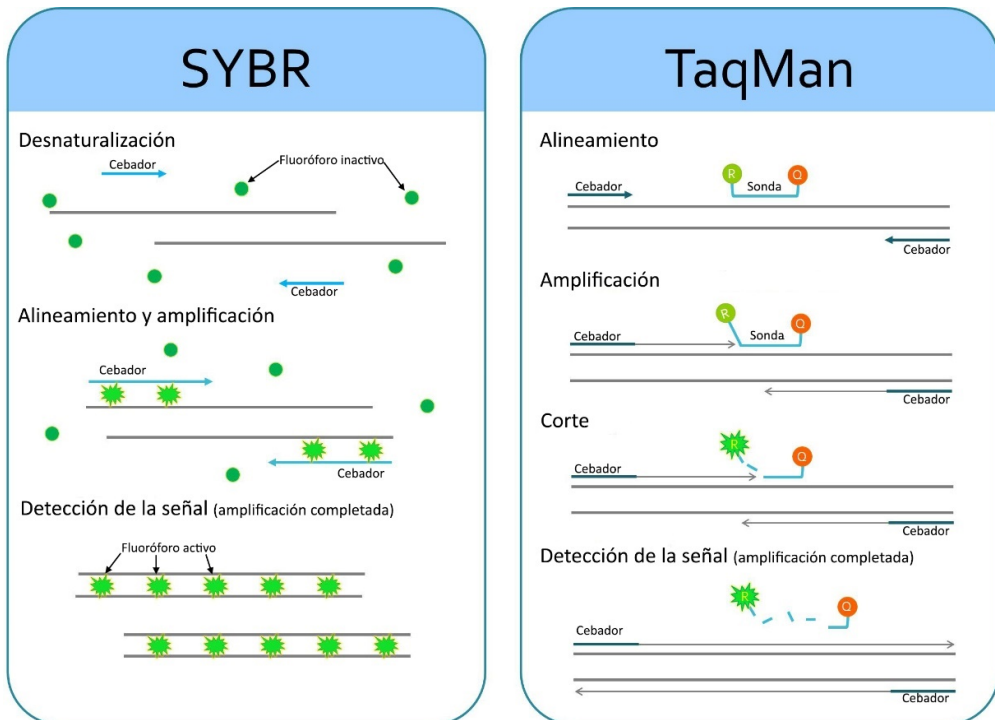


Figura 29. Comparación entre las sondas SYBR y las sondas TaqMan (fuente: Smobio).

La mezcla de reacción se preparó en placas de 96 pocillos específicas para q-PCR, de forma que cada pocillo contenía 10 µL de NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2x) (NZYtech, Lisboa, Portugal), 1 µL del ensayo Taqman (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos) dirigido frente al gen a estudiar, 4 µL de la muestra de ADNc y agua libre de nucleasas hasta alcanzar un volumen final de 20 µL. Las placas de q-PCR se diseñaron de tal forma que cada condición se realizaba por triplicado. Para cada una de las sondas Taqman utilizadas se realizó un control negativo que en lugar de ADNc contenía agua y, como controles endógenos se utilizaron ensayos Taqman dirigidos frente al gen de la proteína gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) y frente al ARN ribosómico 18S. Los controles negativos sirven para comprobar que los reactivos empleados no contienen ningún tipo de contaminación, mientras que como control endógeno se utilizan sondas específicas de genes que se expresan de forma constitutiva y constante en todas las células independientemente del tratamiento. Por lo tanto, variaciones en la fluorescencia emitida por diferentes muestras al amplificar los genes control, implica que se han añadido distintas cantidades de ADNc. Los controles endógenos son, por lo tanto, útiles para normalizar la expresión génica con respecto a la cantidad de ADNc añadido. En la **Tabla 8** se muestran todos los ensayos Taqman utilizados a lo largo del estudio.

Gen	Ensayo Taqman
<i>GAPDH</i>	Hs02786624_g1
<i>18S</i>	Hs03003631_g1
<i>CAT</i>	Hs00156308_m1
<i>NFE2L2</i>	Hs00975961_g1
<i>OGG1</i>	Hs00213454_m1
<i>ABCC1</i>	Hs00219905_m1
<i>XBP-1</i>	Hs00964359_m1
<i>XBP-1s</i>	Hs03929085_g1
<i>GPX2</i>	Hs01591589_m1

Tabla 8. Código de identificación de los ensayos Taqman utilizados para cada gen específico.

Una vez preparadas las placas, se sellaron utilizando un adhesivo específico para placas de PCR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos) para evitar la evaporación del contenido y se introdujeron en el equipo *7300 Real Time PCR System* (Applied Biosystems™, Foster City, CA, Estados Unidos). El programa de ciclos de temperatura utilizados fue: una incubación inicial a 50°C durante 2 minutos, seguido de 10 minutos de incubación a 95°C para activar la polimerasa y, finalmente 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos (desnaturalización) y 60°C durante 1 minuto (alineamiento y amplificación).

Tras finalizar la reacción, el equipo proporciona un valor Ct (del inglés, *Cycle threshold*) para cada uno de los pocillos. El Ct es el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente supere un umbral establecido por el propio equipo. Así, el valor de Ct es inversamente proporcional a la expresión del gen diana. Para normalizar el resultado se restó el Ct obtenido para el gen estudiado menos el Ct obtenido con el control endógeno, lo que se conoce como el valor ΔCt y, la expresión relativa se calculó mediante la fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

3.16. Estudios de microscopía

3.16.1. Microscopia de fluorescencia

Para evaluar si se producía la ruptura de la membrana plasmática en las líneas celulares tratadas con CLyTA-DAO durante tiempos cortos se utilizó el marcaje con yoduro de propidio que, como se ha mencionado anteriormente, es impermeable a la membrana celular.

En este caso, las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 350.000-400.000 células por pocillo y se mantuvieron 24 horas en incubación. A continuación, fueron tratadas con CLyTA-DAO y D-Ala durante 6 horas y, al finalizar el tiempo de tratamiento, se retiró el medio de los pocillos y fue reemplazado por 1 mL de PBS que contenía yoduro de propidio a una concentración de 15 $\mu\text{g/mL}$. La placa se

mantuvo 30 minutos en oscuridad y las células se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-U) equipado con una cámara digital (Nikon DS-1QM).

3.16.2. Inmunocitoquímica mediante microscopia confocal.

El estudio de la localización de AIF en el interior celular se realizó mediante técnicas de inmunofluorescencia. Estos experimentos se realizaron gracias a la colaboración del Grupo de Investigación de Genética Humana y Mamíferos de la Universidad de Alicante.

Inicialmente, se sembraron las células en placas de 24 pocillos a una densidad entre 75.000-100.000 células por pocillo y se incubaron durante 24 horas antes de añadir el tratamiento. Cada uno de los pocillos contenía en el fondo un cubreobjetos redondo sobre el que se sembraron las células. Una vez adheridas al cubreobjetos, las células se trataron con CLyTA-DAO y D-Ala durante 1, 3 y 6 horas. Tras finalizar el tiempo de tratamiento, las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron añadiendo 1 mL de paraformaldehído al 4% en PBS y manteniéndolas 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas, se permeabilizaron incubándolas con Tritón X-100 al 0,2% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y con agitación suave y, posteriormente, se bloquearon los sitios de unión inespecíficos añadiéndoles una solución de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma Aldrich®, San Luis, MO, Estados Unidos) al 1% en PBS durante 1 hora en agitación. A continuación, se añadió el anticuerpo Anti-AIF (#4642, Cell Signaling Technology®, Danvers, MA, Estados Unidos) a una dilución 1/100 en tampón de bloqueo (5% de suero de conejo y 0,3% de Tritón X-100 en PBS 1X) y se mantuvo toda la noche a 4°C. Finalmente, las células se incubaron 1 hora en oscuridad con el anticuerpo secundario Anti-IgG de conejo marcado con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos) a una dilución 1/100 en tampón de bloqueo y con el compuesto 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a 10 µg/mL para visualizar los núcleos. Tras cada una de las incubaciones mencionadas se realizaron 3 lavados con PBS, cada uno de los cuales se mantuvo 5 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente.

Tras el protocolo de tinción, los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos y se les añadió una gota de medio de montaje de fluorescencia CitiFluor™ AF1, formado por una solución de PBS y glicerol. Se eliminó el exceso de medio y los cubreobjetos se sellaron con esmalte de uñas. Por último, se observó y fotografió la fluorescencia utilizando un microscopio espectral confocal y multifotónico Leica TCS SP2. El anticuerpo de AIF marcado con Alexa Fluor 488 emite fluorescencia a 515 nm (verde) y para excitarlo se utilizó un láser azul de Argón que excita en un rango de 450-490 nm. Para detectar el compuesto DAPI se utilizó un láser diodo ultravioleta (UV) con una longitud de onda de emisión de 405 nm (azul).

3.18. Estudio del estado de fosforilación de proteínas

Con el fin de evaluar el nivel de fosforilación de las proteínas que participan en la ruta de señalización de las MAPK (ERK 1/2, p38 α y JNK 1/2/3) y de NF- κ B en la subunidad p65 se utilizaron los kits InstantOne ELISA™ (eBioscience®, San Diego, CA, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

3.18.1. Lisados celulares y cuantificación de proteínas

Las células se sembraron en frascos de cultivo T25 y se mantuvieron en incubación hasta alcanzar una confluencia del 80%. A continuación, se trataron con CLytA-DAO y D-Ala durante tiempos muy cortos de 30 minutos o 1 hora dependiendo del ensayo. Una vez finalizado el tratamiento, se retiró el medio de cultivo, se reemplazó por PBS y las células se separaron utilizando raspadores. El PBS se descartó tras una centrifugación de 5 minutos a 400 x g y las células se resuspendieron en 500 μ L de una mezcla de lisis formada por tampón de lisis (que contiene una combinación de detergentes, inhibidores de fosfatasa y sales) y un compuesto potenciador en una proporción 1:10. Las células se mantuvieron con la mezcla de lisis 10 minutos en agitación suave y a temperatura ambiente.

Una vez lisadas las células, se determinó la concentración de proteínas en cada muestra utilizando el reactivo de tinción del ensayo de proteínas de Bio-Rad (*Bio-Rad*

Protein Assay. Dye Reagent Concentration, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Estados Unidos), basado en el método Bradford, un procedimiento sencillo y preciso para determinar la concentración de proteínas. El reactivo está formado por una disolución de ácido fosfórico y metanol que contiene el reactivo Azul Brillante de Coomassie® G-250, que en condiciones ácidas presenta un color rojizo y al unirse a los aminoácidos de las proteínas, pierde protones y adquiere un color azul, con un máximo de absorbancia a 595 nm. De esta forma, la absorbancia obtenida a 595 nm es proporcional a la concentración de proteínas, que se puede calcular mediante la ecuación de Lambert-Beer.

Para poder determinar la concentración proteica de nuestra muestra, fue necesario realizar una recta de calibrado utilizando BSA en un rango de concentraciones 1-20 µg/mL. Para ello, se prepararon las distintas diluciones de BSA en placas de 96 pocillos, para formar la recta patrón, y se añadieron pocillos adicionales con 5 µL de cada uno de los lisados celulares, todos ellos por triplicado y en un volumen final de 160 µL. A continuación, a todos los pocillos se les añadieron 40 µL del reactivo de tinción, se incubó la placa 5 minutos en agitación y se midió la absorbancia a 595 nm en el lector de placas Gen5™. Finalmente, se determinó la concentración proteica de los lisados interpolando su valor de absorbancia en la recta de calibrado.

3.18.2. Ensayo de ELISA

Un ELISA (del inglés, *enzyme-linked immunosorbent assay*) es un ensayo que permite detectar ligandos mediante el uso de anticuerpos específicos y enzimas que al entrar en contacto con su sustrato producen una señal detectable. Existen varios tipos de ELISA (directo, sándwich, competitivo y reverso) aunque nosotros utilizamos un ELISA tipo sándwich, formado por pocillos cuya superficie está recubierta con un anticuerpo que detecta el ligando que queremos estudiar, de modo que, tras añadir la muestra lisada, el ligando queda unido al anticuerpo. Para eliminar todo aquello que no se haya unido, se realiza un lavado y, a continuación, se añade un nuevo anticuerpo que también se une al ligando, formando una estructura tipo sándwich. A continuación, se añade un nuevo anticuerpo que se une a este último y que llevaría unida la enzima. Tras un último lavado para eliminar todos los anticuerpos que no se hayan unido, se añade un compuesto

químico, que es sustrato de la enzima y al entrar en contacto con ella se convierte en una señal colorimétrica o fluorescente (**Figura 30**). La cuantificación de la absorbancia o fluorescencia aportará información sobre la cantidad de ligando presente en la muestra. En concreto, los ELISA InstantOne son más sencillos de utilizar que los tradicionales y, además, reducen el tiempo del ensayo ya que los anticuerpos de detección se encuentran previamente unidos a la superficie de los pocillos.

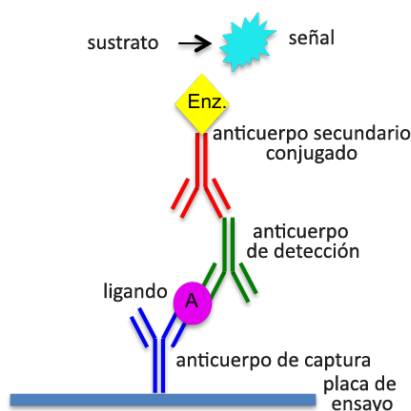


Figura 30. Esquema de un ELISA tipo sándwich (Fuente: Nordic BioSite).

Una vez obtenidos los lisados celulares, añadimos 50 μL de la muestra a las tiras de pocillos proporcionadas por el kit. Como control negativo se utilizaron 50 μL de mezcla de lisis y como control positivo 50 μL de un lisado celular también proporcionado. Cada condición se añadió por triplicado y para cada una de las proteínas a estudiar. A continuación, se añadieron 50 μL de la mezcla de anticuerpos que contiene los anticuerpos de captura y de detección, se cubrieron los pocillos con un adhesivo para evitar evaporaciones y se incubaron en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente. Para descartar todos aquellos restos y anticuerpos que no se hubieran unido, se realizaron tres lavados con 200 μL de tampón de lavado y, finalmente, se añadieron 100 μL del reactivo de detección, que es el sustrato de la enzima. La reacción enzimática se incubó 20 minutos, hasta que en los pocillos se observó un color azulado, y se paró añadiendo 100 μL de la solución de parada. La absorbancia se midió con un lector de placas Gen5™ a 450 nm.

3.19. Análisis estadísticos

Los experimentos realizados en placas de 6 pocillos se replicaron al menos en tres ocasiones ($n \geq 3$), mientras que los que se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos se repitieron un mínimo de 6 veces ($n \geq 6$). Una vez obtenidos los resultados, para su representación se calcularon la media y la desviación estándar (SD). Para calcular los valores de IC50 se realizó un análisis de regresión no lineal.

Para conocer el tipo de distribución de los datos se utilizó la prueba estadística de Shapiro-Wilk, de tal forma que para niveles de significación superiores a 0,05 se consideró que los datos mostraban una distribución normal (gaussiana) y en caso contrario la distribución se consideró asimétrica. Seguidamente, para determinar si los cambios observados entre muestras controles y tratadas eran significativos, se calculó el valor estadístico T de Student, siempre y cuando los datos presentaran una distribución normal y varianzas homogéneas. En caso contrario, se utilizó el valor U de Mann-Whitney. En cambio, para determinar si existían diferencias significativas entre grupos de valores, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) si los datos mostraban una distribución normal y el ensayo estadístico de Kruskal-Wallis si los datos seguían una distribución asimétrica. Las comparaciones que mostraron un p-valor inferior a 0,05 se consideraron estadísticamente significativas. Esto se ha indicado marcando con * si el p-valor $< 0,05$, ** si el p-valor $< 0,01$ y *** si el p-valor $< 0,001$. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prism v7 (GraphPad Software Inc.).

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

**La ciencia avanza mejor cuando las observaciones
nos obligan a cambiar nuestras ideas preconcebidas.**

VERA RUBIN.

4.1. Evaluación del efecto antiproliferativo de CLytA-DAO

4.1.1. Ensayos dosis-respuesta

Para iniciar el análisis de CLytA-DAO como agente anticancerígeno, se evaluó su efecto antiproliferativo sobre líneas celulares de distinto origen mediante ensayos de dosis-respuesta utilizando el reactivo MTT. Las células se trataron con diferentes concentraciones de CLytA-DAO, en un rango entre 0,025 y 2 U/mL, en combinación con 1 mM de D-Ala durante 72 horas. En estudios previos, se había determinado que el aminoácido D-Ala es la mejor opción en cuanto a eficiencia catalítica [112] y que su constante de Michaelis-Menten aparente ($K_{M,ap}$) es 1 mM [111,128].

Este estudio se realizó en líneas celulares de CP, CCR y GBM, entre estas últimas se incluyen dos comerciales y seis obtenidas a partir de cultivos primarios por nuestro grupo de investigación en el HGUE. En todas las líneas celulares se observó un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración, sin embargo, la sensibilidad fue variable (**Figura 31, Tabla 9**). Con 2 U/mL de CLytA-DAO el porcentaje de disminución de la proliferación celular fue considerablemente homogéneo entre las diferentes líneas celulares y estuvo comprendido entre 82,3% y 92,8%, sin embargo, con dosis más bajas se observó mayor variabilidad del efecto, obteniendo con 0,5 U/mL valores de inhibición en un rango de 34,0–87,9% (**Figura 31, Tabla 9**). Los valores de IC_{50} mostraron que, en general, las células de GBM son más resistentes que las de CP o CCR y, concretamente, las células más resistentes al efecto antiproliferativo son HT-29 de CCR, seguidas de T98 y HGUE-GB-42 de GBM (**Tabla 9**).

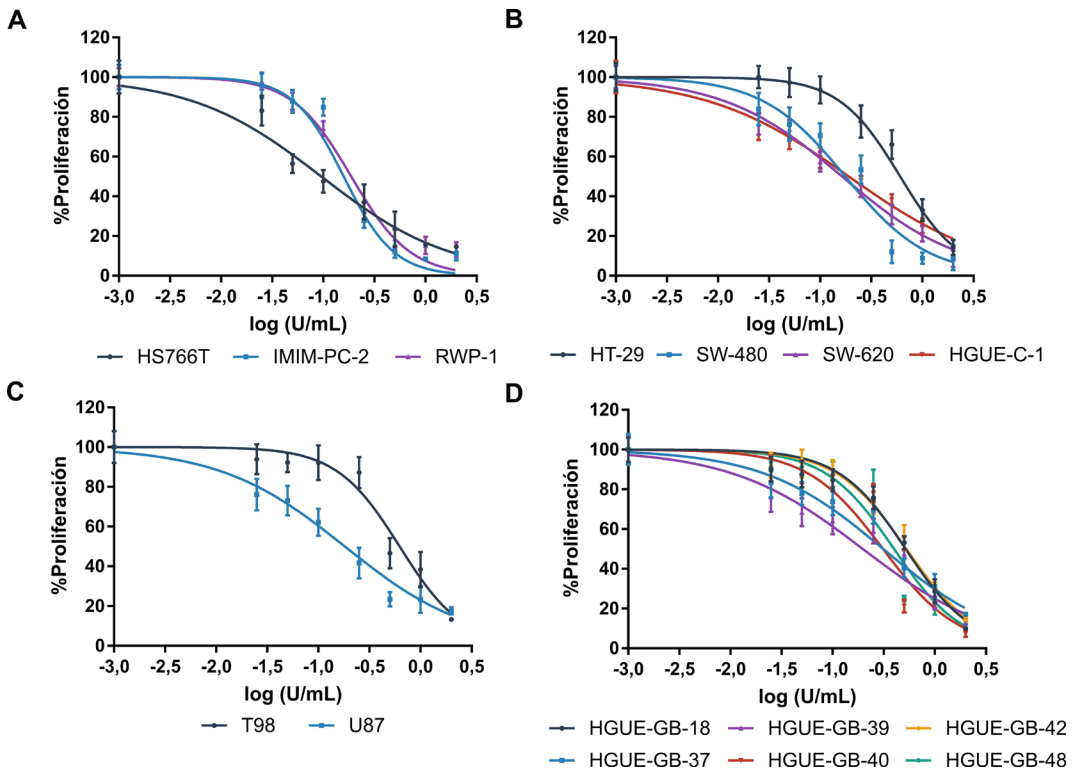


Figura 31. Efecto de CLyA-DAO sobre la proliferación celular. Las células se trataron con CLyA-DAO en un rango de concentraciones entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 72 horas. Las gráficas muestran el resultado obtenido en las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y en las líneas celulares comerciales (C) y derivadas de cultivos primarios de glioblastoma (D). Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$).

Resultados

Origen	Línea celular	%Inhibición ±	%Inhibición ±	IC ₅₀ ± SD (U/mL)
		SD con 0,5 U/mL	SD con 2 U/mL	
Carcinoma de páncreas	Hs766T	76,57 ± 8,81	85,31 ± 0,52	0,10 ± 0,01
	IMIM-PC-2	87,94 ± 2,98	88,78 ± 3,56	0,18 ± 0,02
	RWP-1	81,13 ± 5,28	86,95 ± 3,77	0,19 ± 0,02
Carcinoma de colon	HT-29	33,99 ± 7,27	85,78 ± 3,82	0,66 ± 0,03
	SW-480	87,92 ± 5,70	90,90 ± 6,24	0,18 ± 0,03
	SW-620	69,13 ± 4,95	91,44 ± 4,13	0,16 ± 0,01
	HGUE-C-1	61,80 ± 2,88	86,93 ± 0,85	0,18 ± 0,02
Glioblastoma (Líneas celulares comerciales)	T98	53,43 ± 7,65	86,70 ± 0,37	0,60 ± 0,07
	U87	76,55 ± 3,55	82,31 ± 1,80	0,16 ± 0,02
Glioblastoma (Líneas celulares derivadas de cultivos primarios)	HGUE-GB-18	46,99 ± 3,37	90,10 ± 0,88	0,50 ± 0,05
	HGUE-GB-37	59,69 ± 4,82	82,89 ± 0,59	0,37 ± 0,06
	HGUE-GB-39	52,59 ± 5,92	87,48 ± 0,66	0,25 ± 0,05
	HGUE-GB-40	78,75 ± 3,16	92,76 ± 1,49	0,34 ± 0,06
	HGUE-GB-42	44,47 ± 6,46	85,31 ± 1,21	0,53 ± 0,03
	HGUE-GB-48	74,85 ± 1,31	87,84 ± 3,24	0,39 ± 0,06

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular junto con el valor de IC₅₀ de CLyTA-DAO. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma se trataron en un rango de concentraciones de CLyTA-DAO entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 72 horas.

Con el fin de confirmar que 1 mM es la dosis óptima de D-Ala para obtener el máximo efecto de CLyTA-DAO, se repitieron los ensayos de MTT a 72 horas en algunas de las líneas celulares, pero esta vez, manteniendo la concentración de CLyTA-DAO constante a 2 U/mL y variando la dosis de D-Ala en un rango de 0,1-2 mM. Los resultados no sólo confirmaron que 1 mM es la dosis de D-Ala a la que se produce el mayor efecto, sino que indicaron que dosis superiores de D-Ala disminuyen el efecto antiproliferativo de CLyTA-DAO (**Figura 32**). Los valores de IC₅₀ para la D-Ala mostraron un patrón de sensibilidad similar al observado con las curvas dosis-respuesta realizadas con diferentes concentraciones de CLyTA-DAO (**Tabla 10**). Las líneas celulares IMIM-PC-2 de CP y SW-480 de CCR presentaron una sensibilidad similar y la línea celular T98 de GBM fue bastante resistente al efecto antiproliferativo inducido por CLyTA-DAO y D-Ala (**Figura 32, Tabla 10**).

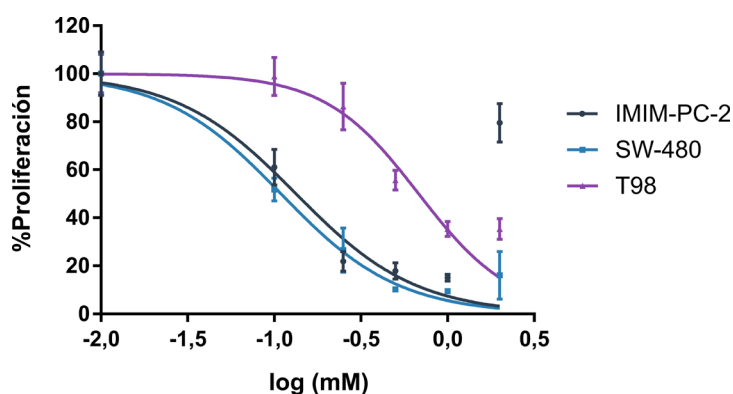


Figura 32. Efecto antiproliferativo de 2 U/mL de ClytA-DAO con diferentes concentraciones de D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, SW-480 y T98 se trataron con una concentración constante de ClytA-DAO junto con D-Ala en un rango entre 0,1-2 mM durante 72 horas. Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$).

Origen	Línea celular	IC ₅₀ \pm SD (mM)
Carcinoma de páncreas	IMIM-PC-2	0,13 \pm 0,02
Carcinoma de colon	SW-480	0,10 \pm 0,01
Glioblastoma	T98	0,65 \pm 0,05

Tabla 10. Valores de IC₅₀ de la D-Ala utilizando una concentración constante de 2 U/mL de ClytA-DAO. Las líneas celulares IMIM-PC-2, SW-480 y T98 se trataron con una concentración constante de ClytA-DAO junto con D-Ala en un rango entre 0,1-2 mM durante 72 horas.

4.1.2. Estudio del mecanismo de inhibición de la proliferación celular inducido por ClytA-DAO

La reducción de la proliferación celular inducida por el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala puede deberse tanto a un efecto citotóxico como a un efecto citostático. Con el objetivo de poder diferenciar si las células se mueren o se produce un bloqueo del ciclo celular en alguna de sus fases, se realizó un análisis de la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo tras haber sido tratadas con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas.

En la **Figura 33** se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular tras haberles restado el porcentaje observado en las células control. De este modo, los valores positivos implican un aumento de células en esa fase del ciclo, mientras que los valores negativos hacen referencia a un descenso. El resultado indica que el efecto

general del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala fue citotóxico, ya que en todas las líneas celulares aumentó el porcentaje de células en la fase SubG₁ con respecto al control (**Figura 33**).

En las líneas celulares de CP, se produjo un aumento del porcentaje de células en fase SubG₁ de aproximadamente un 40% en IMIM-PC-2 y RWP-1, mientras que Hs766T parece ser la línea celular más resistente al tratamiento, ya que el aumento del porcentaje de células muertas fue del $6,8 \pm 5,2\%$ (**Figura 33A, Tabla 11**). Con respecto a las líneas celulares de CCR, SW-480, SW-620 y HGUE-C-1, mostraron una sensibilidad similar a la muerte celular inducida por CLytA-DAO (**Figura 33B, Tabla 11**). Sin embargo, en HT-29 se produjo un ligero aumento de las fases SubG₁ y G₂/M, que en ninguno de los casos resultó ser significativo (**Figura 33B, Tabla 11**). En las líneas celulares comerciales de GBM se observó un efecto intermedio al determinado en las líneas celulares catalogadas como sensibles y resistentes (**Figura 33C, Tabla 11**). Por último, en las líneas celulares de GBM derivadas de cultivos primarios obtenidos por nuestro grupo de investigación, el incremento de la fase SubG₁ estuvo en un rango entre 16% - 32% (**Figura 33D, Tabla 11**).

Con estos datos, las células se pueden clasificar en altamente sensibles (SubG₁ > 30%: IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-C-1 y HGUE-GB-37), moderadamente sensibles (SubG₁ = 20-30%: U87, HGUE-GB-18, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40 y HGUE-GB-48), moderadamente resistentes (SubG₁ = 10-20%: T98 y HGUE-GB-42) y resistentes (SubG₁ < 10%: Hs766T y HT-29), en función de los niveles de muerte celular inducidos por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala (**Tabla 11**).

Resultados

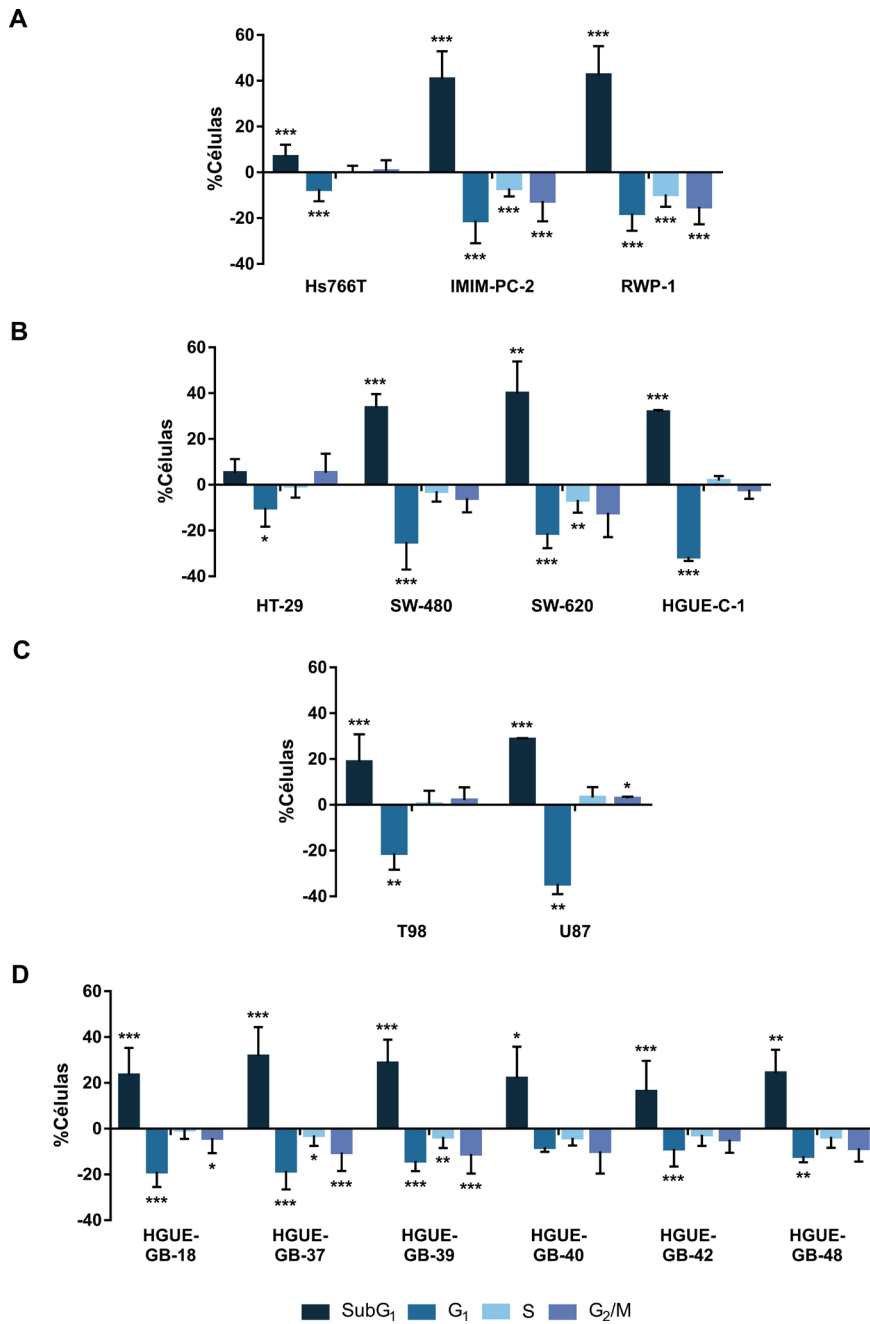


Figura 33. Efecto del tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala sobre el ciclo celular. Las células se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Las gráficas muestran el resultado obtenido en las líneas celulares de carcinoma de páncreas (**A**), carcinoma colorrectal (**B**) y en las líneas celulares comerciales (**C**) y derivadas de cultivos primarios de glioblastoma (**D**). Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Resultados

Origen	Línea celular	% de células en fase SubG ₁ ± SD	Grado de sensibilidad
Carcinoma de páncreas	Hs766T	6,8 ± 5,2%	Resistente
	IMIM-PC-2	40,7 ± 12,2%	Sensible
	RWP-1	42,5 ± 12,7%	Sensible
Carcinoma de colon	HT-29	5,2 ± 6,0%	Resistente
	SW-480	33,6 ± 6,0%	Sensible
	SW-620	39,9 ± 14,0%	Sensible
	HGUE-C-1	31,8 ± 0,8%	Sensible
Glioblastoma (Líneas celulares comerciales)	T98	18,7 ± 12,1%	Moderadamente resistente
	U87	28,6 ± 0,6%	Moderadamente sensible
Glioblastoma (Líneas celulares derivadas de cultivos primarios)	HGUE-GB-18	23,4 ± 12,0%	Moderadamente sensible
	HGUE-GB-37	31,6 ± 12,7%	Sensible
	HGUE-GB-39	28,6 ± 10,2%	Moderadamente sensible
	HGUE-GB-40	22,0 ± 13,8%	Moderadamente sensible
	HGUE-GB-42	16,2 ± 13,4%	Moderadamente resistente
	HGUE-GB-48	24,3 ± 10,2%	Moderadamente sensible

Tabla 11. Porcentaje de células en fase SubG₁ tras el tratamiento con CLytA-DAO. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Las células se han dividido en cuatro categorías en función del grado de sensibilidad: sensibles (verde), moderadamente sensibles (amarillo), moderadamente resistentes (naranja) y resistentes (rojo).

A continuación, se repitió el análisis del ciclo celular utilizando tiempos de tratamiento de 48 y 72 horas para comprobar si las líneas celulares que habíamos catalogado como resistentes realmente lo eran o simplemente requerían de más tiempo de tratamiento. En el caso de la línea celular Hs766T, el porcentaje de células en la fase SubG₁ aumentó a 15,2 ± 10,6% tras 48 horas y a 23,2 ± 13,5% y tras 72 horas de tratamiento (**Figura 34**). Un aumento similar se observó en HT-29, que tras 48 horas de tratamiento alcanzaron un 11,1 ± 3,6% de células en la fase SubG₁ y tras 72 horas un 17,8 ± 8,6% (**Figura 34**). En ambos casos, aunque se produjo un aumento del porcentaje de células muertas, no se llegaron a alcanzar los niveles observados en las líneas celulares sensibles. El mayor aumento se observó en la línea celular T98, alcanzando un 50,9 ± 12,2% de células en fase SubG₁ tras 48 horas de tratamiento y un 55,7 ± 12,2% tras 72 horas (**Figura 34**).

Resultados

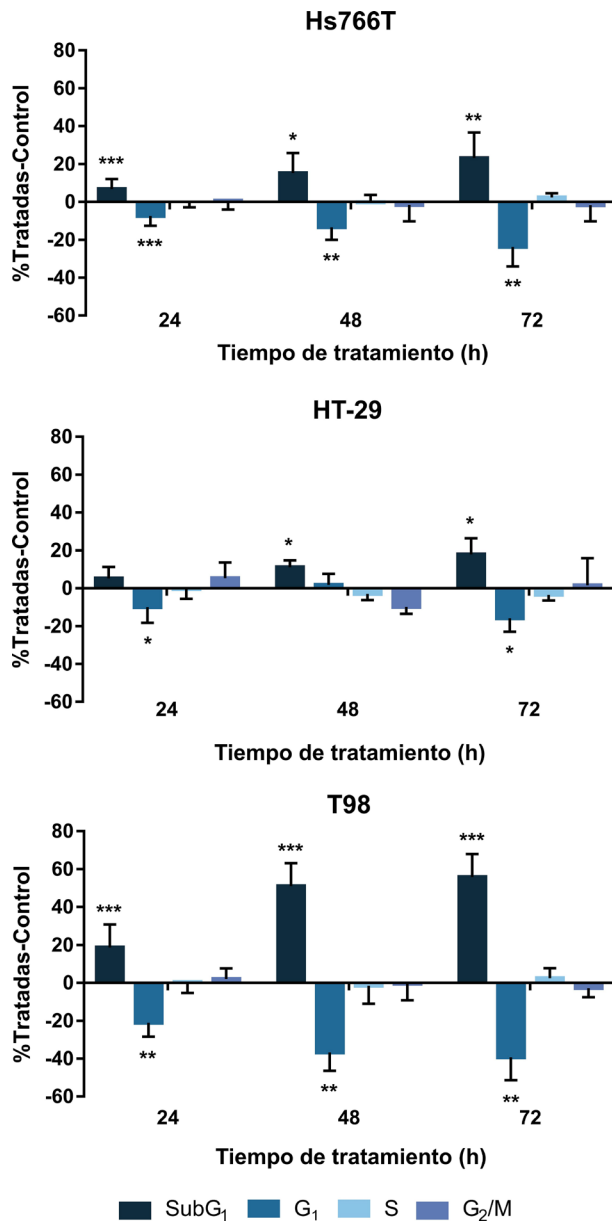


Figura 34. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala durante 24, 48 y 72 horas sobre el ciclo celular. Las líneas celulares Hs766T, HT-29 y T98 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24, 48 y 72 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

El siguiente paso fue evaluar los niveles de muerte celular producidos por el tratamiento manteniendo las condiciones anteriores, pero utilizando un ensayo de viabilidad basado en el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática. En general, el porcentaje de células muertas aumentó considerablemente con respecto a los resultados obtenidos con el análisis del ciclo celular (**Figura 35**). El perfil de sensibilidad varió ligeramente, lo que sugiere que algunas líneas celulares sufren más daños a nivel de membrana plasmática mientras que otras los sufren a nivel de fragmentación del ADN. En este sentido, el resultado obtenido con la línea celular de glioblastoma T98 sí que mostró un comportamiento totalmente diferente al observado en el análisis del ciclo celular. Mientras que los resultados anteriores parecían indicar una resistencia parcial (**Figura 33C**) o muerte celular tardía (**Figura 34**), los resultados del ensayo de viabilidad indicaron unos niveles de muerte muy similares a los observados en las líneas celulares sensibles (**Figura 35**).

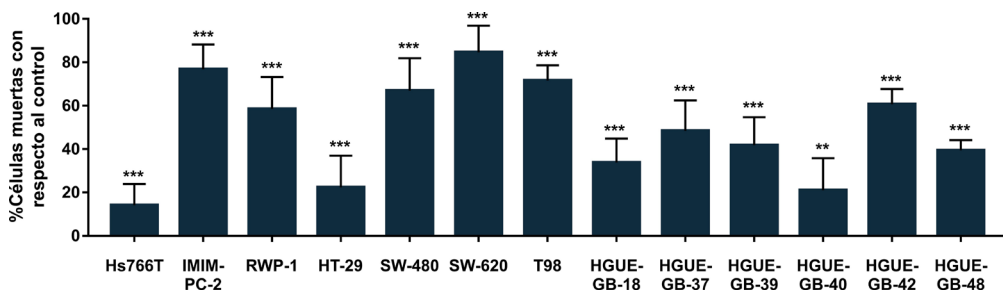


Figura 35. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala sobre la viabilidad celular. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y la integridad de la membrana plasmática se analizó con el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de células muertas \pm SD tras haberle restado el porcentaje de células muertas en el control ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Una vez determinada la efectividad del tratamiento con CLytA-DAO para inducir muerte celular en líneas tumorales, se evaluó su efecto sobre células no tumorales. Se utilizaron cultivos primarios de linfocitos establecidos a partir de muestras de sangre obtenidas de análisis rutinarios del HGUE realizados en pacientes no oncológicos ni infecciosos, líneas celulares de adipocitos de ratón (3T3-L1) y líneas celulares humanas de fibroblastos (1BR3.G e IMR90) y páncreas (HPDE). Las células se trataron de nuevo con 2

U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas antes de analizar la distribución en el ciclo celular. Apenas se observó efecto del tratamiento en la mayoría de las células testadas, con la excepción de la línea celular IMR90, en la que se produjo una acumulación significativa de las células en fase SubG₁ (18,2 ± 10,0%) (**Figura 36**).

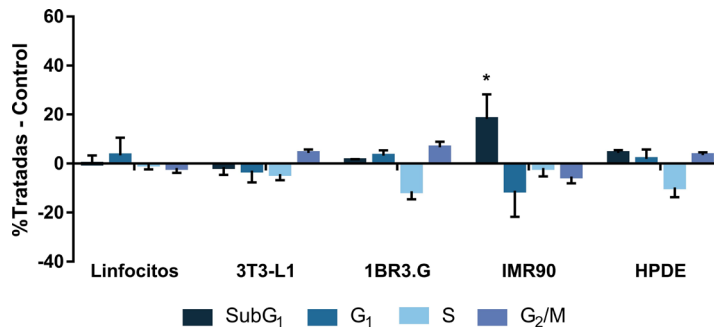


Figura 36. Efecto del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala sobre el ciclo celular de células de origen no tumoral. Las células fueron tratadas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular ± SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control (n ≥ 3). * indica un p-valor < 0,05.

4.1.3. Efecto antiproliferativo de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas

Para que una terapia enzimática sea eficaz como tratamiento anticancerígeno, no sólo es necesario que presente actividad antitumoral, sino que también es importante poder dirigirla hacia el tumor y que durante el proceso no sea degradada por el organismo y mantenga su actividad catalítica. Para ello, en esta ocasión, se evaluó de nuevo su efecto antiproliferativo inmovilizada en NPM. Se utilizó una inmovilización no covalente gracias a la afinidad del dominio CLytA por la colina y análogos, como el DEAE.

Antes de iniciar el estudio, se realizaron ensayos de MTT y análisis del ciclo celular para descartar una posible citotoxicidad de las nanopartículas utilizadas. Para los ensayos de MTT, las células se trataron durante 72 horas con la CLytA-DAO inmovilizada en NPM en un rango de dosis de 0,05 - 5 U/mL sin añadir D-Ala. Los resultados obtenidos en la línea celular IMIM-PC-2 de CP indicaron que la enzima inmovilizada en NPM, sin D-Ala, no disminuye la proliferación celular (**Figura 37A**).

Resultados

Para confirmar el resultado, las células se trataron con 5 y 10 U/mL de CLytA-DAO inmovilizada en NPM durante 24 horas, sin añadir D-Ala y, finalizado el tiempo de tratamiento, se analizó la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular mediante citometría de flujo. En este caso, tampoco se obtuvieron cambios significativos en la distribución de las células en el ciclo celular con respecto al control (**Figura 37B**). Los resultados obtenidos en el resto de las líneas celulares fueron muy similares y, en ningún caso disminuyó la viabilidad celular.

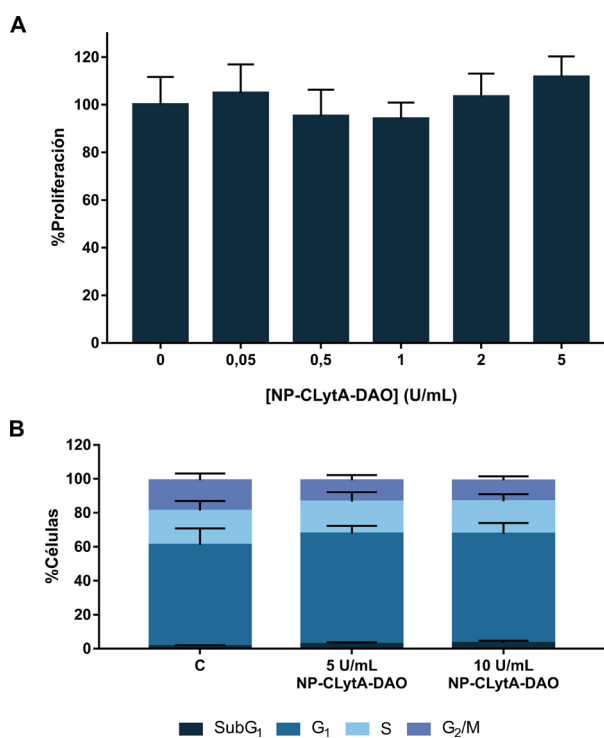


Figura 37. Evaluación de la toxicidad de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre las células IMIM-PC-2. (A) Las células se trataron con CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un rango de concentraciones entre 0,05-5 U/mL durante 72 horas. Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). **(B)** Las células se trataron con 5 y 10 U/mL de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas durante 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD ($n \geq 3$).

A continuación, se realizaron las curvas dosis-respuesta mediante el ensayo MTT tras tratar las células durante 72 horas utilizando un rango de dosis de CLytA-DAO inmovilizada en NPM comprendido entre 0,025 y 2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala. Por lo

general, la enzima inmovilizada en NPM resultó ser más efectiva que la enzima libre, aunque las mayores diferencias se observaron en aquellas líneas celulares menos sensibles al efecto antiproliferativo inducido por CLytA-DAO libre (**Figura 38, Tabla 12**).

En las líneas celulares de CP se observó un mayor efecto antiproliferativo al utilizar la enzima inmovilizada en NPM, aunque en la línea celular IMIM-PC-2, los cambios fueron menos pronunciados (**Figura 38A, Tabla 12**). Las variaciones son más evidentes al observar el porcentaje de inhibición de la proliferación celular a dosis bajas. Por ejemplo, al tratar las células Hs766T con 0,025 U/mL de CLytA-DAO, el porcentaje de inhibición aumentó de $16,9 \pm 7,5\%$ con la enzima libre a $50,3 \pm 2,9\%$ con la enzima inmovilizada (**Figura 38A, Tabla 12**). En cambio, en RWP-1 las variaciones se produjeron con dosis más altas, así con 0,25 U/mL el porcentaje aumentó de $67,2 \pm 4,0\%$ con CLytA-DAO libre a $80,2 \pm 4,3\%$ con CLytA-DAO inmovilizada en NPM (**Figura 38A, Tabla 12**).

En las líneas celulares de CCR sucedió algo similar, observándose las diferencias más pronunciadas en la línea celular HT-29, que es la más resistente al tratamiento con CLytA-DAO libre y D-Ala (**Figura 38B, Tabla 12**). En cuanto a los valores de IC_{50} , el mayor descenso se produjo en HT-29, seguido de SW-620 y SW-480, mientras que no se produjeron grandes cambios en HGUE-C-1 (**Tabla 12**). Al comparar los porcentajes de inhibición de la proliferación celular con dosis bajas de CLytA-DAO (0,025 y 0,25 U/mL), libre e inmovilizada en NPM, junto con 1 mM de D-Ala, el efecto fue notablemente más alto al utilizar la enzima inmovilizada en NPM en todas las líneas celulares de CCR (**Figura 38B, Tabla 12**).

Con respecto a las células de GBM, aunque en las líneas celulares comerciales (T98 y U87) no fue tan evidente el beneficio de la inmovilización en NPM en cuanto a un aumento del efecto antiproliferativo (**Figura 38C, Tabla 12**), en las líneas celulares derivadas de cultivos primarios sí que se observó un incremento del efecto al utilizar la enzima inmovilizada en NPM (**Figura 38D, Tabla 12**). Los valores de IC_{50} de la enzima libre se encontraban entre 0,25-0,53 U/mL y al inmovilizar CLytA-DAO en NPM descendieron a 0,03-0,06 U/mL (**Tabla 12**). El efecto antiproliferativo de CLytA-DAO inmovilizada en NPM aumentó tanto con 0,025 como con 0,25 U/mL con respecto a la enzima libre. Por ejemplo, en HGUE-GB-18 el porcentaje de inhibición de la proliferación celular inducido

por 0,025 U/mL aumentó de $10,0 \pm 6,2\%$ a $31,5 \pm 3,4\%$ y con 0,25 U/mL aumentó de $24,4 \pm 5,7\%$ a $80,6 \pm 3,7\%$ (Figura 38D, Tabla 12). Esto se mantuvo en el resto de las líneas celulares de glioblastoma derivadas de los cultivos primarios establecidos por nuestro grupo de investigación (Figura 38D, Tabla 12).

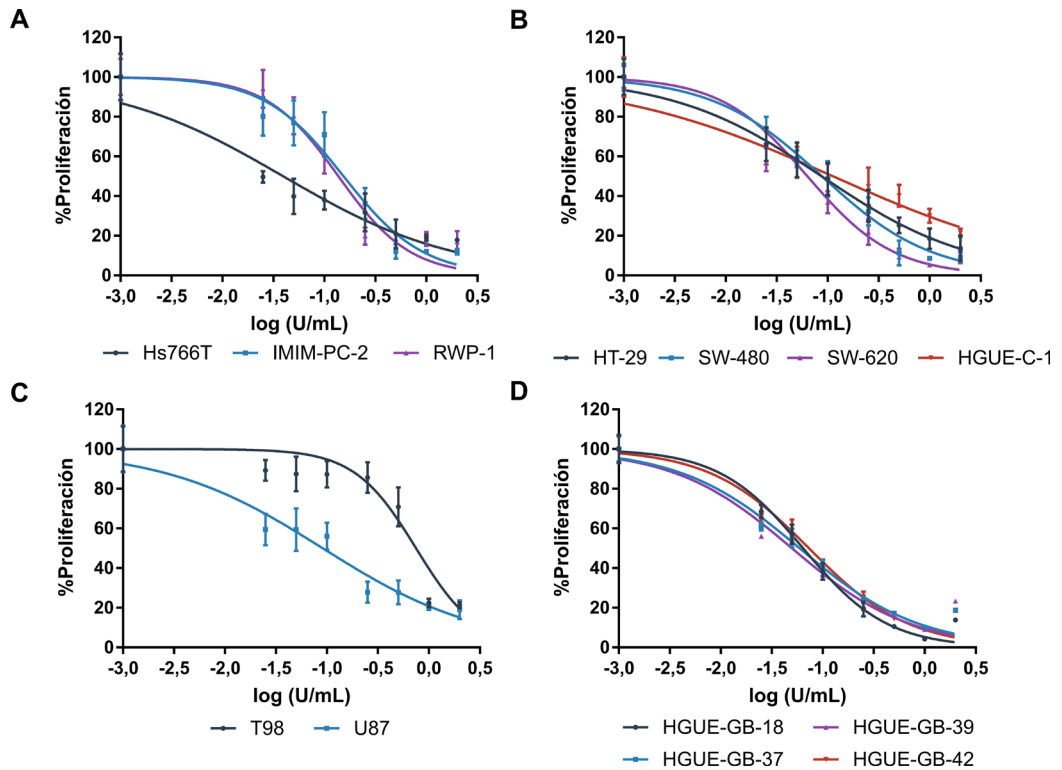


Figura 38. Efecto de CLyTA-DAO inmobilizada en nanopartículas magnéticas sobre la proliferación celular. Las células se trataron con CLyTA-DAO inmobilizada en un rango de concentraciones entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 72 horas. Las gráficas muestran el resultado obtenido en las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y en las líneas celulares comerciales (C) y derivadas de cultivos primarios de glioblastoma (D). Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$).

Resultados

Origen	Línea celular	%Inhibición \pm SD con 0,025 U/mL		%Inhibición \pm SD con 0,25 U/mL		IC ₅₀ \pm SD (U/mL)
		Libre	NP	Libre	NP	
Carcinoma de páncreas	Hs766T	16,9 \pm 7,5	50,3 \pm 2,9	62,9 \pm 8,8	68,2 \pm 9,5	0,05 \pm 0,01
	IMIM-PC-2	4,3 \pm 6,2	19,9 \pm 9,7	72,1 \pm 3,7	63,7 \pm 7,8	0,15 \pm 0,02
	RWP-1	2,0 \pm 4,3	5,9 \pm 9,5	67,2 \pm 4,0	80,2 \pm 4,3	0,14 \pm 0,03
Carcinoma de colon	HT-29	0,1 \pm 5,6	33,9 \pm 8,5	22,4 \pm 8,1	64,9 \pm 8,1	0,10 \pm 0,02
	SW-480	16,1 \pm 8,1	26,9 \pm 6,9	46,6 \pm 7,1	67,7 \pm 7,0	0,09 \pm 0,01
	SW-620	23,6 \pm 5,4	41,7 \pm 5,8	57,3 \pm 3,2	78,1 \pm 6,4	0,05 \pm 0,01
	HGUE-C-1	25,0 \pm 6,7	35,8 \pm 8,2	52,1 \pm 2,3	55,2 \pm 9,6	0,14 \pm 0,05
Glioblastoma (Líneas celulares comerciales)	T98	6,2 \pm 7,5	10,7 \pm 5,3	12,8 \pm 7,8	14,3 \pm 7,7	0,68 \pm 0,15
	U87	24,0 \pm 7,9	40,5 \pm 7,9	58,4 \pm 7,7	72,2 \pm 5,3	0,10 \pm 0,02
Glioblastoma (Líneas celulares derivadas de cultivos primarios)	HGUE-GB-18	10,0 \pm 6,2	31,5 \pm 3,4	24,4 \pm 5,7	80,6 \pm 3,7	0,06 \pm 0,01
	HGUE-GB-37	16,6 \pm 7,6	39,2 \pm 2,0	30,7 \pm 6,7	76,2 \pm 1,6	0,06 \pm 0,01
	HGUE-GB-39	23,8 \pm 7,5	43,9 \pm 0,7	41,0 \pm 6,3	78,9 \pm 2,1	0,05 \pm 0,01
	HGUE-GB-42	7,8 \pm 6,4	34,9 \pm 2,3	26,9 \pm 5,4	74,5 \pm 2,7	0,07 \pm 0,01

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de la proliferación celular tras el tratamiento con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, junto con el valor de IC₅₀ de la enzima inmovilizada. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma se trataron en un rango de concentraciones de CLytA-DAO entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 72 horas. Se representa el porcentaje antiproliferativo obtenido con 0,025 U/mL o 0,25 U/mL de CLytA-DAO y el valor de IC₅₀ de CLytA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas.

En el apartado anterior se determinó que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala produce un efecto citotóxico detectable a través de la fase SubG₁ del ciclo celular (**Figura 33**). Por ello, a continuación, se realizó una comparación del porcentaje de células en la fase SubG₁ tras el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO, libre o inmovilizada en NPM, junto con 1 mM de D-Ala durante 24 horas. El porcentaje de células muertas inducido por la enzima inmovilizada fue superior al observado con la enzima libre en todas las líneas celulares de CP (**Figura 39A**), CCR (**Figura 39B**) y GBM (**Figura 39C**). Sin embargo, este cambio sólo fue significativo en IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, HGUE-C-1, HGUE-GB-18 y

Resultados

HGUE-GB-37. En concordancia con los resultados observados en los MTT, los mayores cambios se produjeron en las líneas celulares de GBM derivadas de los cultivos primarios.

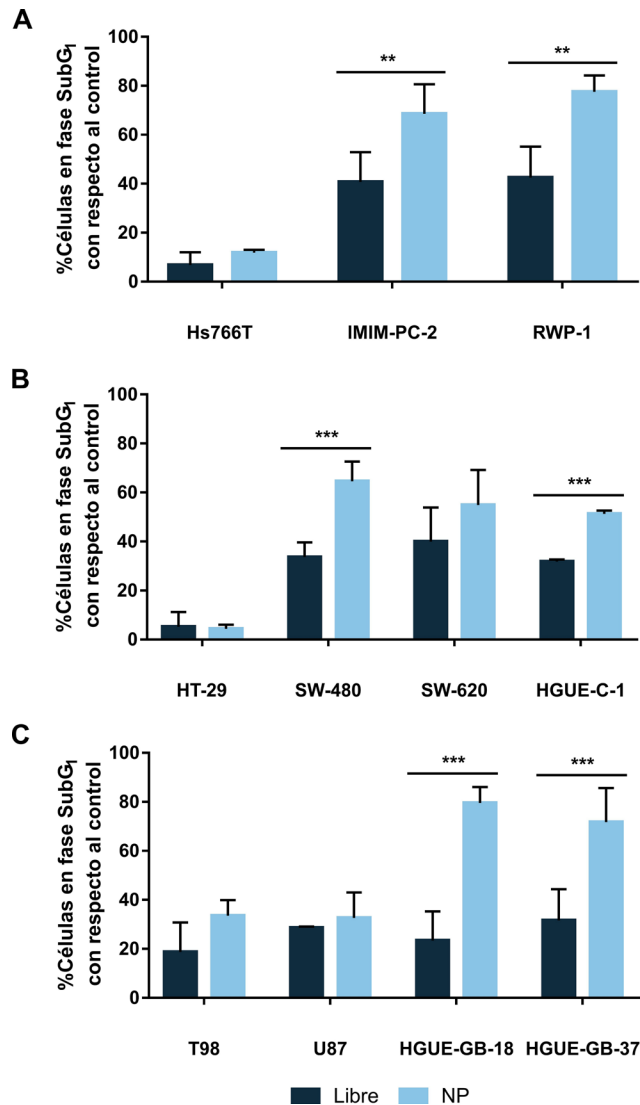


Figura 39. Variación del porcentaje de células muertas tras ser tratadas con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y glioblastoma (C) se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y el porcentaje de células en fase SubG₁ se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células tratadas en fase SubG₁ ± SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control (n ≥ 3). ** indica un p-valor < 0,01 y *** < 0,001.

La diferencia observada entre el efecto citotóxico inducido por la enzima libre e inmovilizada en NPM en las líneas celulares de GBM era previsible en base a los resultados

observados en los ensayos de MTT (**Tabla 9, Tabla 12**). Sin embargo, en las líneas celulares de CP y CCR sensibles al efecto citotóxico inducido por CLyTA-DAO, esta diferencia fue superior a la esperada. En dicho caso, los experimentos de MTT mostraron diferencias sutiles y, en algunos casos, casi inapreciables, entre la enzima libre o inmovilizada en NPM (**Tabla 9, Tabla 12**).

La discrepancia entre los resultados esperados y los observados podría deberse a los tiempos de tratamiento utilizados en ambos ensayos, ya que los MTT fueron realizados tras 72 horas de tratamiento, mientras que los análisis del ciclo celular se realizaron tras 24 horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. Generalmente, las líneas celulares de CP y CCR son más sensibles al efecto citotóxico producido por CLyTA-DAO libre que las líneas celulares de GBM (**Figura 33, Figura 35**). Dado que el efecto inducido por la enzima libre ya era muy elevado en estas líneas celulares con tan sólo 24 horas de tratamiento, puede suceder que, al aumentar dicho tiempo a 72 horas, la muerte celular inducida por la enzima libre se igualara con la inducida por la enzima inmovilizada en NPM.

Con el fin de comprobar esta hipótesis, se repitieron los ensayos de MTT con la enzima libre e inmovilizada en NPM en dos líneas celulares de CP, IMIM-PC-2 y RWP-1, y dos de CCR, SW-480 y SW-620, utilizando 24 horas de tratamiento. Esta disminución del tiempo de tratamiento indujo una disminución en el efecto antiproliferativo de la enzima y se pudieron apreciar mejor las diferencias entre el efecto inducido por CLyTA-DAO libre o inmovilizada en NPM (**Figura 40, Tabla 13**).

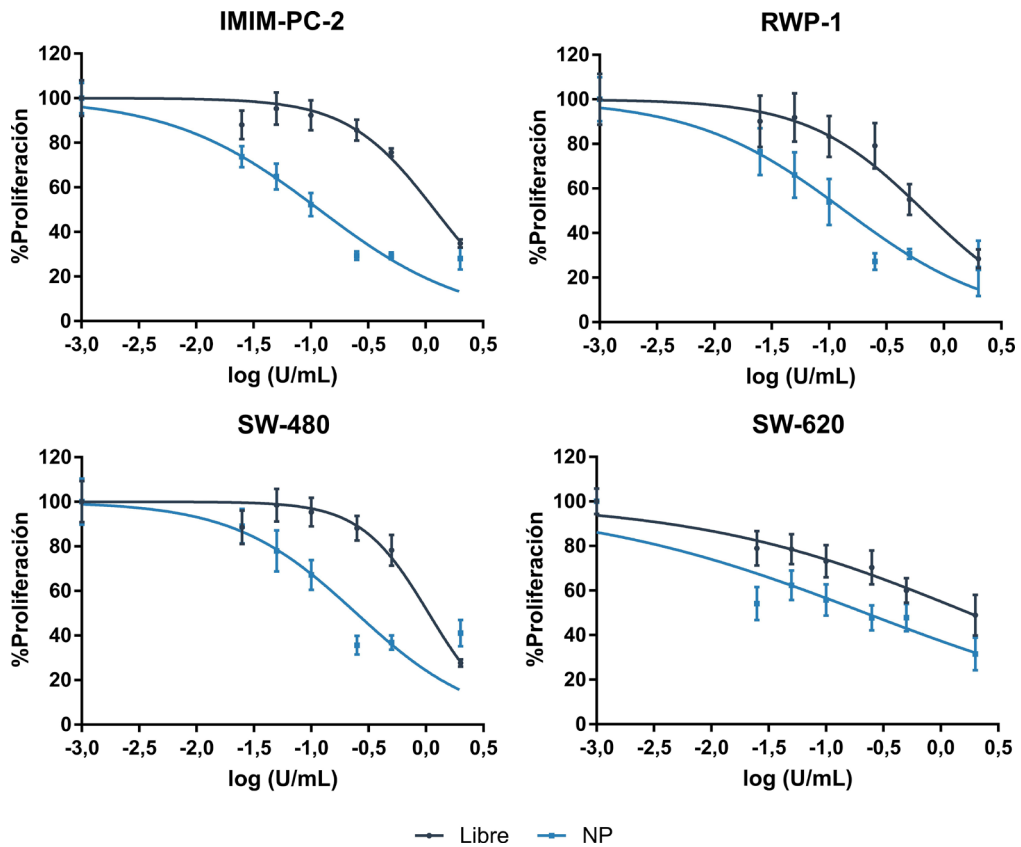


Figura 40. Efecto de CLyTA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas sobre la proliferación celular tras 24 horas de tratamiento. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de carcinoma de páncreas y SW-480 y SW-620 de carcinoma colorrectal se trataron con CLyTA-DAO inmovilizada en nanopartículas magnéticas en un rango de concentraciones entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$).

En la línea celular IMIM-PC-2, tras 72 horas de tratamiento apenas hubo diferencias en el efecto antiproliferativo al utilizar la enzima libre (IC_{50} : $0,18 \pm 0,02$) o inmovilizada (IC_{50} : $0,15 \pm 0,02$) (**Tabla 13**). Sin embargo, al disminuir el tiempo de tratamiento a 24 horas, el valor de IC_{50} para CLyTA-DAO libre aumentó a $1,22 \pm 0,18$, mientras que con la enzima inmovilizada en NPM se mantuvo muy similar al observado tras 72 horas de tratamiento (IC_{50} : $0,12 \pm 0,03$) (**Tabla 13**). De igual modo, la diferencia entre el efecto antiproliferativo inducido por la DAO libre e inmovilizada se incrementó al reducir el tiempo de tratamiento a 24 horas en el resto de las líneas celulares estudiadas (**Tabla 13**).

Resultados

Origen	Línea celular	IC ₅₀ ± SD (U/mL)		IC ₅₀ ± SD (U/mL)	
		24 h		72 h	
		Libre	NP	Libre	NP
Carcinoma de páncreas	IMIM-PC-2	1,22 ± 0,18	0,12 ± 0,03	0,18 ± 0,02	0,15 ± 0,02
	RWP-1	0,73 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,03
Carcinoma de colon	SW-480	1,08 ± 0,13	0,30 ± 0,12	0,18 ± 0,03	0,09 ± 0,01
	SW-620	1,95 ± 0,41	0,18 ± 0,06	0,16 ± 0,01	0,05 ± 0,01

Tabla 13. Comparación de los valores de IC₅₀ de CLytA-DAO, libre e inmovilizada en nanopartículas magnéticas, tras 24 o 72 horas de tratamiento. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de carcinoma de páncreas y SW-480 y SW-620 de carcinoma colorrectal se trataron en un rango de concentraciones de CLytA-DAO entre 0,025-2 U/mL junto con 1 mM de D-Ala durante 24 o 72 horas.

Los datos presentados hasta el momento indicaban que la inmovilización de la enzima en NPM no sólo iba a facilitar su transporte hacia la región tumoral, sino que además mejoraba su efecto citotóxico. Por lo tanto, el siguiente paso fue averiguar por qué la enzima inmovilizada presentaba un efecto superior al observado en su estado libre. Una posible explicación era que la enzima inmovilizada en NPM iniciara su efecto sobre las células más rápidamente que en su estado libre. Para comprobarlo, se realizaron análisis del ciclo celular tratando las células con 2 U/mL de CLytA-DAO, libre e inmovilizada en NPM, junto con 1 mM de D-Ala durante tiempos cortos. Este estudio se llevó a cabo en IMIM-PC-2 de CP, SW-480 de CCR y HGUE-GB-18 de GBM. El tratamiento se mantuvo durante un rango de tiempo comprendido entre 15 minutos y 1 hora. Finalizado el tiempo correspondiente, se retiró el medio que contenía el tratamiento, se reemplazó por medio fresco y se mantuvieron las células en incubación hasta completar las 24 horas. Puesto que el objetivo era determinar los cambios producidos a nivel de ciclo celular, era necesario que finalizasen las 24 horas desde la adición del tratamiento para dar tiempo a las células a completar un ciclo celular.

Tras el análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo, se observó que en esta ocasión no sólo aumentó el porcentaje de células en la fase SubG₁, correspondiente con las células muertas, sino que también aumentaron las células en la fase G₂/M. Cabe destacar que en IMIM-PC-2 y SW-480 el efecto inicial de la enzima fue bloquear el ciclo celular en la fase G₂/M causando una acumulación de células en dicha fase, las cuales finalmente se convertirían en células muertas (**Figura 41**). En cambio, en la línea celular

HGUE-GB-18 no se observó este bloqueo inicial, sino que tras 1 hora de tratamiento comenzó a aumentar el porcentaje de células muertas directamente (**Figura 41**). Por otra parte, aunque se mantuvo un mayor efecto con la enzima inmovilizada NPM en tiempos cortos de tratamiento, esta diferencia sólo fue significativa en la línea celular IMIM-PC-2 (**Figura 41**). Estos resultados sugieren que, el hecho de que la enzima inmovilizada en NPM tenga un efecto superior al observado en su estado libre, no se debe a que la enzima inmovilizada actúe más rápidamente.

Otra posibilidad era que la enzima inmovilizada fuera más estable en las condiciones del tratamiento y, por ello, mantuviera su actividad durante más tiempo generando un efecto superior al observado al utilizar la enzima libre.

Para comprobar si efectivamente la enzima inmovilizada mantenía su efecto sobre las células durante un tiempo más largo que en su estado libre, antes de añadir el tratamiento sobre las células, se incubaron 2 U/mL de CLytA-DAO, libre e inmovilizada en NPM, en el medio con el que se habían incubado las células, a 37°C durante 0,5, 1, 2 y 3 horas. Pasado este tiempo, la enzima fue añadida sobre las células junto con 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se utilizó el ensayo de viabilidad para determinar variaciones en la muerte celular inducida por el tratamiento.

En las tres líneas celulares utilizadas (IMIM-PC-2 de CP, SW-480 de CCR y HGUE-GB-37 de GBM) se observó que conforme aumenta el tiempo de incubación a 37°C, la enzima va perdiendo actividad, lo que equivale a un descenso del efecto de muerte celular (**Figura 42**). Sin embargo, esta pérdida de actividad se produjo más lentamente al utilizar CLytA-DAO inmovilizada en NPM (**Figura 42**). Con el máximo tiempo de pre-incubación utilizado (3 horas), la enzima libre generó un 62,83 ± 8,74%, 83,19 ± 3,65% y 91,70 ± 1,35% menos de muerte celular en IMIM-PC-2, SW-480 y HGUE-GB-37, respectivamente (**Figura 42**), mientras que cuando se utilizó la enzima inmovilizada, la disminución del efecto, con el mismo tiempo de pre-incubación a 37°C, fue del 47,94 ± 14,25% en IMIM-PC-2, 15,03 ± 9,15% en SW-480 y 30,86 ± 14,55% en HGUE-GB-37 (**Figura 42**).

Resultados

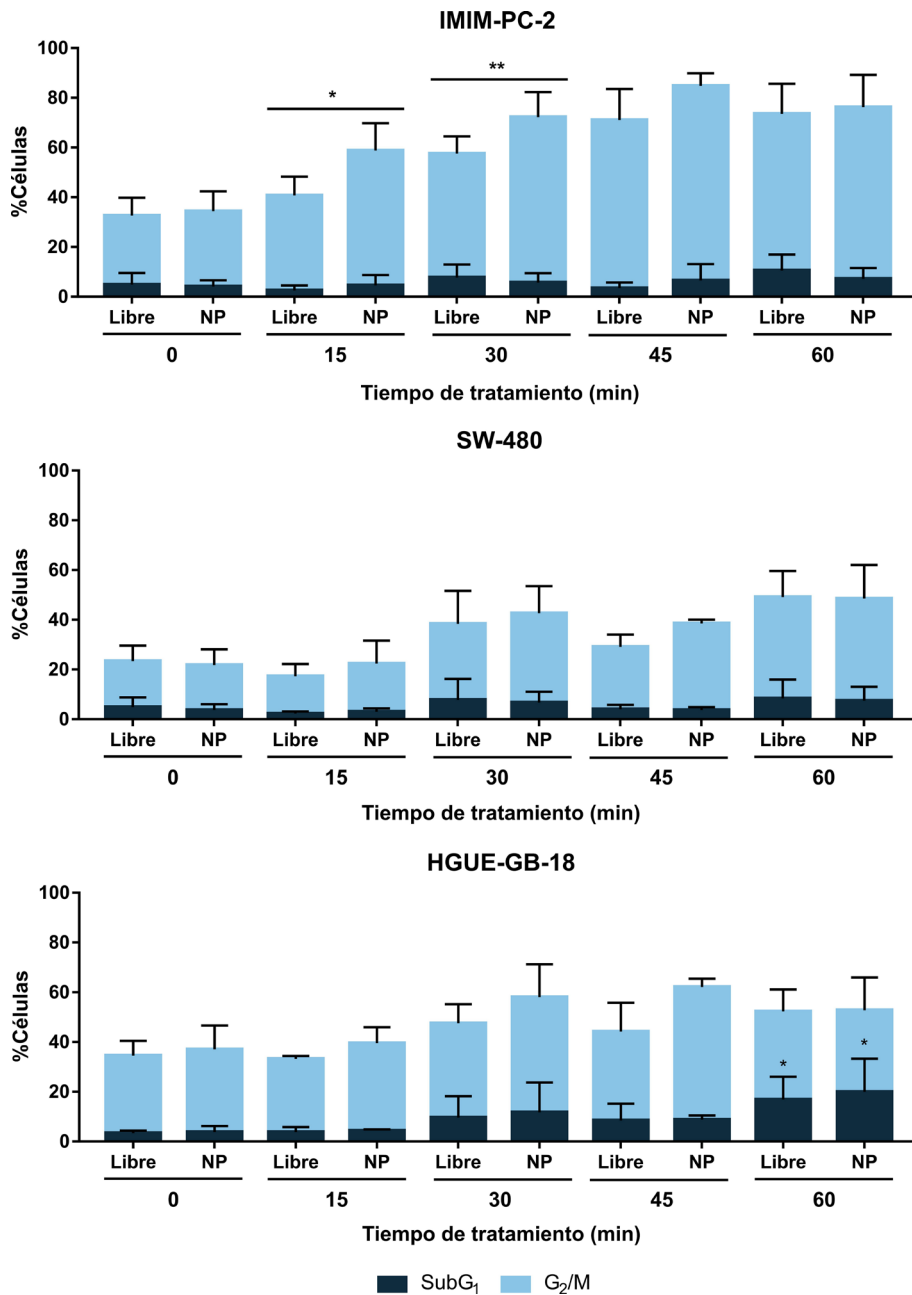


Figura 41. Efecto a tiempos cortos del tratamiento con ClytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, SW-480 y HGUE-GB-18 se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y 1 mM de D-Ala durante un rango de tiempos comprendido entre 15 minutos y 1 hora y, pasado este tiempo, se retiró el tratamiento cambiando el medio de cultivo. A continuación, las células se incubaron hasta finalizar las 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células tratadas en las fases SubG₁ ± SD y G₂/M ± SD (n ≥ 3). * indica un p-valor < 0,05 y ** < 0,01.

Resultados

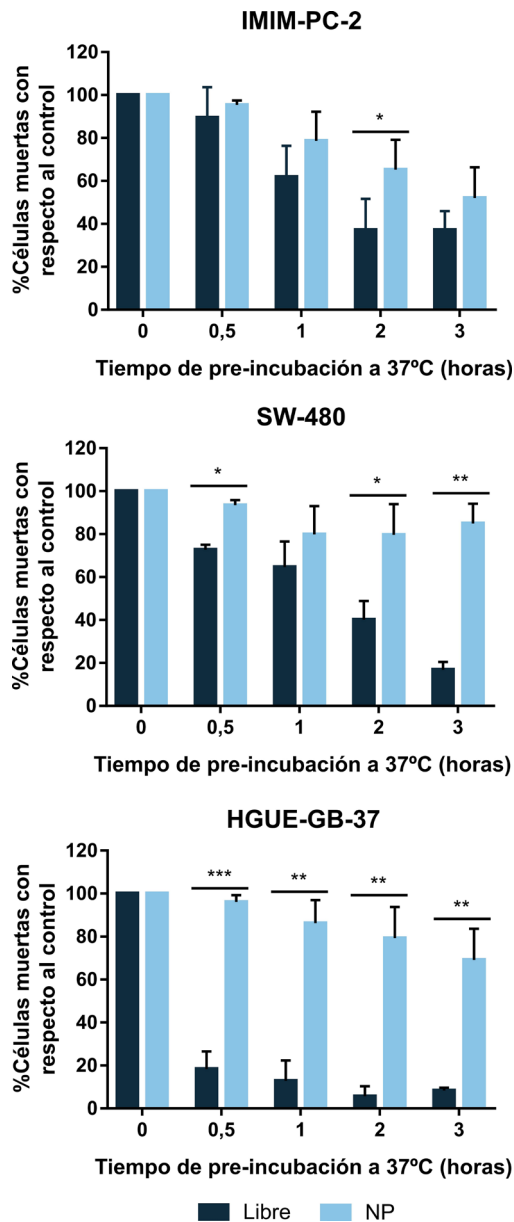


Figura 42. Variación de la muerte celular inducida por CLyTA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, tras haber incubado la enzima a 37°C. Las líneas celulares IMIM-PC-2, SW-480 y HGUE-GB-37 se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO, libre o inmovilizada en nanopartículas magnéticas, y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Antes de añadir la CLyTA-DAO sobre las células, fue incubada a 37°C durante 30 minutos, 1, 2 y 3 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, se evaluó el porcentaje de células muertas utilizando el reactivo de Contaje y Viabilidad y el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de células muertas normalizado con respecto al producido por la enzima sin pre-incubar \pm SD ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Otra ventaja de nuestro sistema de inmovilización es que, dado que la unión entre el dominio CLytA de la enzima y el DEAE de las NPM no es covalente, existe la posibilidad de liberar la enzima de las nanopartículas mediante la adición de colina. Para confirmarlo se realizaron ensayos de MTT en la línea celular SW-480 de CCR. En primer lugar, se evaluó la toxicidad de la colina sobre las células tumorales utilizando dosis crecientes de la misma en un rango de 0,1-100 mM. Tras 72 horas de tratamiento, se observó que 100 mM de colina indujo una disminución del $41,38 \pm 12,14\%$ en la proliferación celular con respecto al control, mientras que el resto de las concentraciones estudiadas (0,1, 1 y 50 mM) no causaron cambios significativos sobre la proliferación celular (**Figura 43A**).

Una vez identificadas las concentraciones de colina seguras para las células tumorales, se realizaron nuevos ensayos de MTT para determinar su efecto sobre CLytA-DAO y si era posible utilizarla para liberar la enzima inmovilizada de las NPM. Por un lado, las células se trataron con CLytA-DAO, libre o inmovilizada en NPM, junto con concentraciones crecientes de colina (0, 0,1, 1 y 50 mM). Por otro lado, se añadió una tercera condición que contenía CLytA-DAO inmovilizada en NPM, que había sido incubada previamente con colina durante 10 minutos con posterior separación de la enzima liberada con la ayuda de un imán. La enzima, tanto libre como inmovilizada en NPM, en combinación con las diferentes dosis de colina mantuvo completamente su efecto (**Figura 43B**). Por otro lado, con la enzima inmovilizada que había sido previamente incubada con colina, se produjo una disminución significativa del efecto al aumentar la cantidad de colina (**Figura 43B**). Este resultado indica que parte de la enzima inmovilizada fue liberada al añadir colina.

En conclusión, la inmovilización no covalente de CLytA-DAO en NPM permite dirigir la enzima hacia la región tumoral, supone un incremento significativo de la muerte celular inducida sobre las células tumorales debido a que mejora su estabilidad en las condiciones de cultivo y, además, es posible liberarla de las NPM mediante la adición externa de colina.

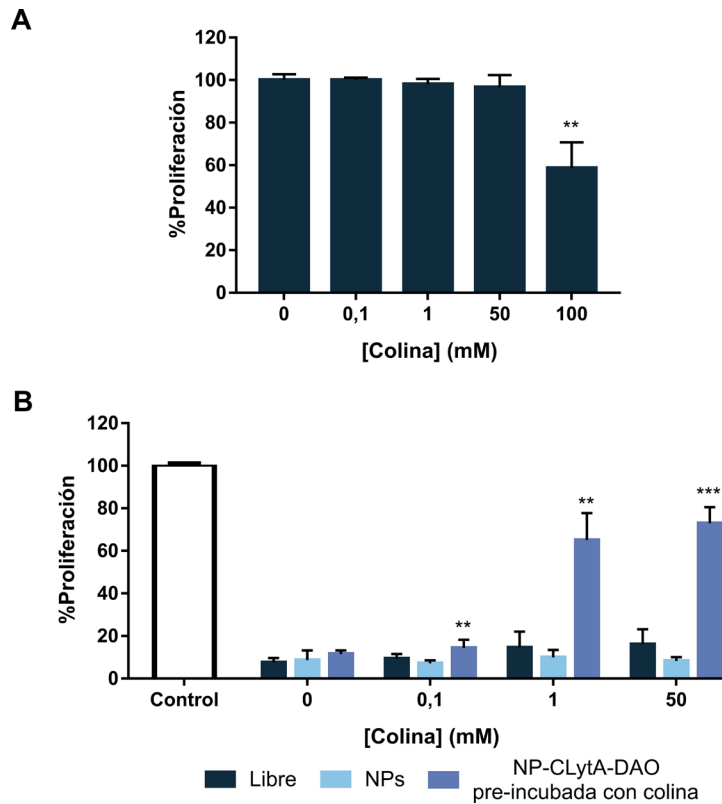


Figura 43. Toxicidad de la colina y su efecto sobre la actividad antiproliferativa de CLytA-DAO. (A) La línea celular SW-480 fue tratada con colina en un rango de concentraciones entre 0,1-100 mM durante 72 horas. (B) La línea celular SW-480 fue tratada con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala, con concentraciones crecientes de colina (0,1-50 mM), durante 72 horas. La enzima se utilizó: libre, inmovilizada en nanopartículas magnéticas e inmovilizada en nanopartículas magnéticas tras haber sido incubada previamente con colina durante 10 minutos. Se representa el porcentaje promedio de proliferación \pm SD con respecto al control (n \geq 6). ** indica un p-valor $<$ 0,01 y *** $<$ 0,001.

4.1.4. Inmovilización en otros soportes

Una vez demostrados los beneficios de inmovilizar la enzima CLytA-DAO en NPM, se estudió la posibilidad de inmovilizarla en otros soportes. Se seleccionaron nanopartículas de oro y cápsulas de alginato. Las nanopartículas de oro utilizadas fueron generosamente cedidas por el grupo del Dr. Jesús Sanz del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

Antes de utilizar la enzima inmovilizada en los diferentes soportes, se midió la actividad enzimática, tal y como se describe en materiales y métodos, y las células fueron

siempre tratadas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. La inmovilización, tanto en nanopartículas de oro como por atrapamiento en cápsulas de alginato, dio lugar a la pérdida de gran parte de su actividad enzimática. Con el fin de que la actividad fuera equivalente en las diferentes condiciones, hubo que añadir más cantidad de enzima inmovilizada.

Sin embargo, a pesar de añadir el volumen necesario de CLytA-DAO para que siempre hubiera 2 U/mL, la muerte celular inducida en IMIM-PC-2 de CP fue significativamente menor con la enzima inmovilizada en ambos tipos de soportes en comparación con la observada con la enzima libre (**Figura 44**). Con la enzima libre se produjo un $76,75 \pm 11,46\%$ de muerte celular, mientras que con la enzima inmovilizada en nanopartículas de oro este porcentaje disminuyó a $29,07 \pm 3,26\%$ y, utilizando la enzima encapsulada en alginato sódico descendió a $38,7 \pm 6,12\%$ (**Figura 44**).

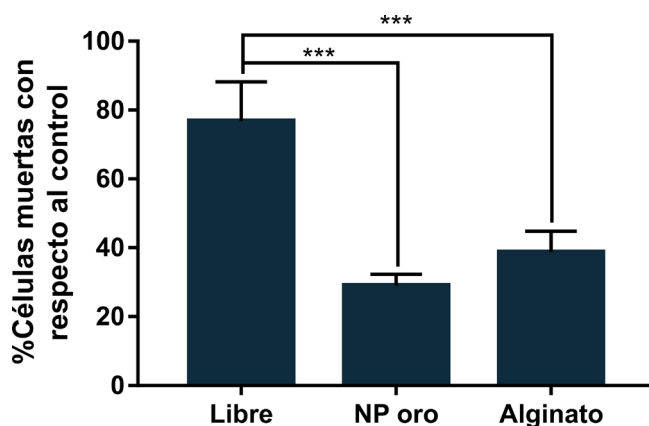


Figura 44. Muerte celular inducida por CLytA-DAO libre, inmovilizada en nanopartículas de oro y encapsulada en alginato. La línea celular IMIM-PC-2 se trató con 2 U/mL de CLytA-DAO, libre o inmovilizada, y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, se evaluó el porcentaje de células muertas utilizando el reactivo de Contaje y Viabilidad y el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de células muertas \pm SD tras haberle restado el porcentaje de células muertas en el control ($n \geq 3$). *** indica un p-valor $< 0,001$.

4.2. Determinar el tipo de mecanismo de muerte celular inducido por CLytA-DAO

4.2.1. Daño celular inducido por el tratamiento con CLytA-DAO

Sabiendo que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala es capaz de inducir la muerte de la mayoría de las líneas celulares de CP, CCR y GBM testadas, el siguiente paso fue determinar el mecanismo que activaba dicha muerte celular.

El estudio se inició cuantificando los niveles de ROS generados durante la reacción catalizada por CLytA-DAO. Para realizar este análisis se seleccionaron varias líneas celulares sensibles a la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala de cada tipo de tumor: IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 y SW-620 de CCR y T98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM. A continuación, las células se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante tiempos cortos comprendidos entre 20 minutos y 2 horas. Además del tratamiento, se añadió la sonda DCFH₂-DA para cada uno de los tiempos y, paralelamente, se realizó un control que contuvo únicamente la sonda con el fin de normalizar el resultado.

En la **Figura 45** se representa el incremento de la intensidad de fluorescencia producido con respecto a su control (*FC, Fold-Change*) para cada uno de los tiempos de tratamiento. Durante los primeros minutos de tratamiento, los niveles de ROS aumentaron significativamente en todas las líneas tumorales de CP (**Figura 45A**), CCR (**Figura 45B**) y GBM (**Figura 45C**) utilizadas.

Aunque en los análisis del ciclo celular ya se había determinado que con 24 horas de tratamiento se generaban daños en el ADN, se evaluó si el aumento de las ROS, durante los primeros minutos de tratamiento, equivalía a un aumento temprano del daño en el ADN. Para ello, se volvieron a tratar las líneas celulares anteriores, sensibles a la muerte celular, con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 0,5, 1, 2 y 3 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, se analizó el daño en el ADN a través de la fosforilación de la histona H2A.X.

Resultados

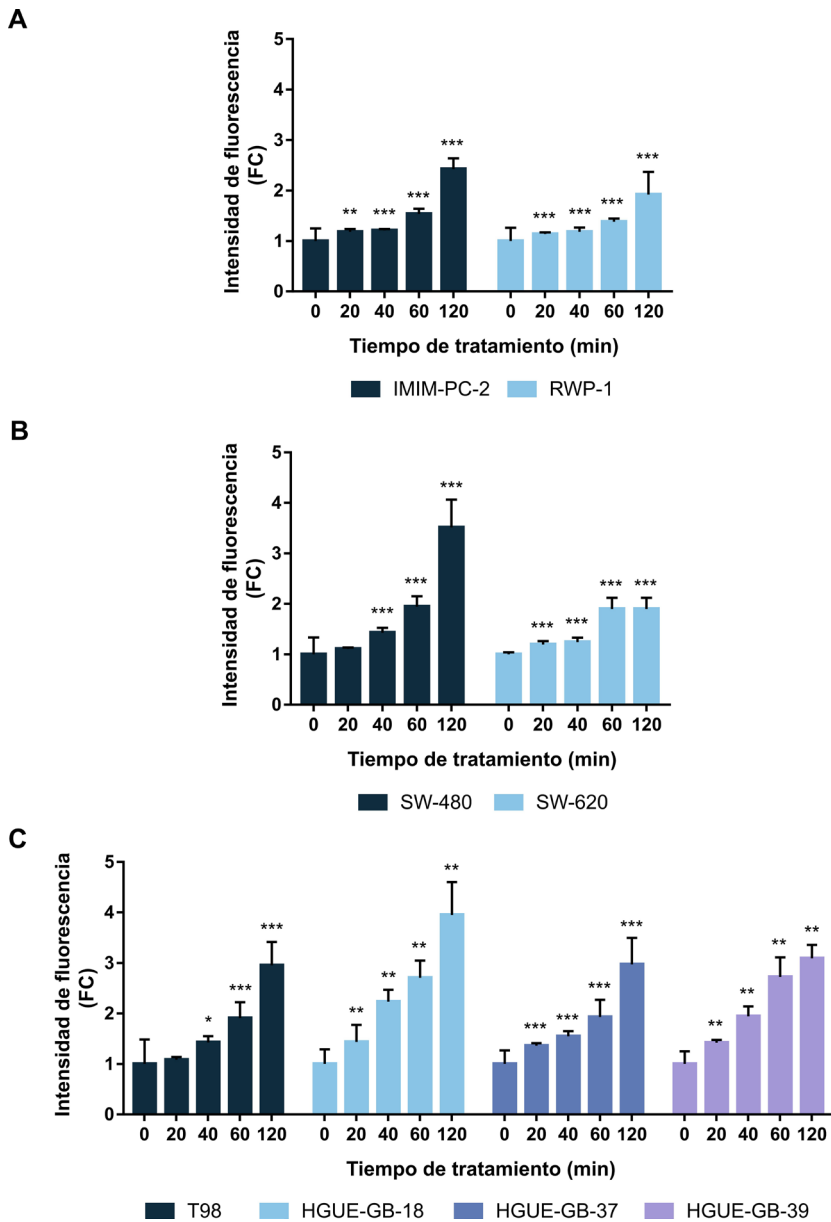


Figura 45. Aumento de las ROS tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y glioblastoma (C) se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante tiempos comprendidos entre 20-120 minutos. Para cada uno de los tiempos, se añadió un control sin tratamiento y, tanto controles como tratados contuvieron la sonda DCFH₂-DA durante el mismo tiempo. Finalizados los tiempos de tratamiento, se midió la intensidad de fluorescencia con el lector de placas POLARstar Omega. Se representa el incremento de la intensidad de fluorescencia \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

De nuevo, se produjo un aumento significativo de la histona H2A.X fosforilada en todas las líneas celulares de CP (**Figura 46A**), CCR (**Figura 46B**) y GBM (**Figura 46C**) sensibles a la muerte inducida por el tratamiento con CLytA-DAO. En el caso de la línea celular T98, la fosforilación de H2A.X descendió a partir de la tercera hora de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, sugiriendo una mayor eficacia en la reparación del daño en el ADN causado por las ROS. Este dato concuerda con el hecho de que no se observara muerte celular en las T98 mediante el análisis del ciclo celular (**Figura 33**).

Seguidamente, se utilizaron dos tipos de estudios para comprobar si el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala generaba daños en la membrana plasmática en las primeras horas de tratamiento. Por una parte, transcurridas 3 y 6 horas desde la adición del tratamiento, se añadió a las células yoduro de propidio, un compuesto fluorescente que se une a los ácidos nucleicos y que es impermeable a la membrana plasmática, y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (**Figura 47**).

En las fotografías realizadas a las dos líneas tumorales de CP utilizadas (IMIM-PC-2 y RWP-1) con el microscopio de fluorescencia, se observó que se producía la entrada de yoduro de propidio, sugiriendo la pérdida de la integridad de la membrana (**Figura 47**). De hecho, a las 6 horas de tratamiento no sólo hubo una entrada de yoduro de propidio, sino que también disminuyó notablemente la cantidad de células en el pocillo (**Figura 47**). Esto era indicativo de que parte de las células habían muerto y, como consecuencia, se habían despegado de la placa y retirado con el medio. Con respecto a las SW-480 de CCR, el marcaje con yoduro de propidio empezó a observarse tras 6 horas de tratamiento (**Figura 47**), sugiriendo que esta línea celular necesita un tiempo superior de tratamiento para que se produzca la rotura de la membrana plasmática. Las líneas celulares de GBM mostraron un comportamiento muy diferente entre ellas. Mientras que en T98 ya se observaba claramente la ruptura de la membrana plasmática tras 3 horas de tratamiento, en HGUE-GB-18 no se llegó a observar el marcaje con yoduro de propidio ni siquiera a las 6 horas de tratamiento (**Figura 47**). El marcaje con yoduro de propidio confirma que las T98 son sensibles a la muerte inducida por el tratamiento con CLytA-DAO, aunque la ruptura de la membrana plasmática se produce más rápidamente que la fragmentación del ADN.

Resultados

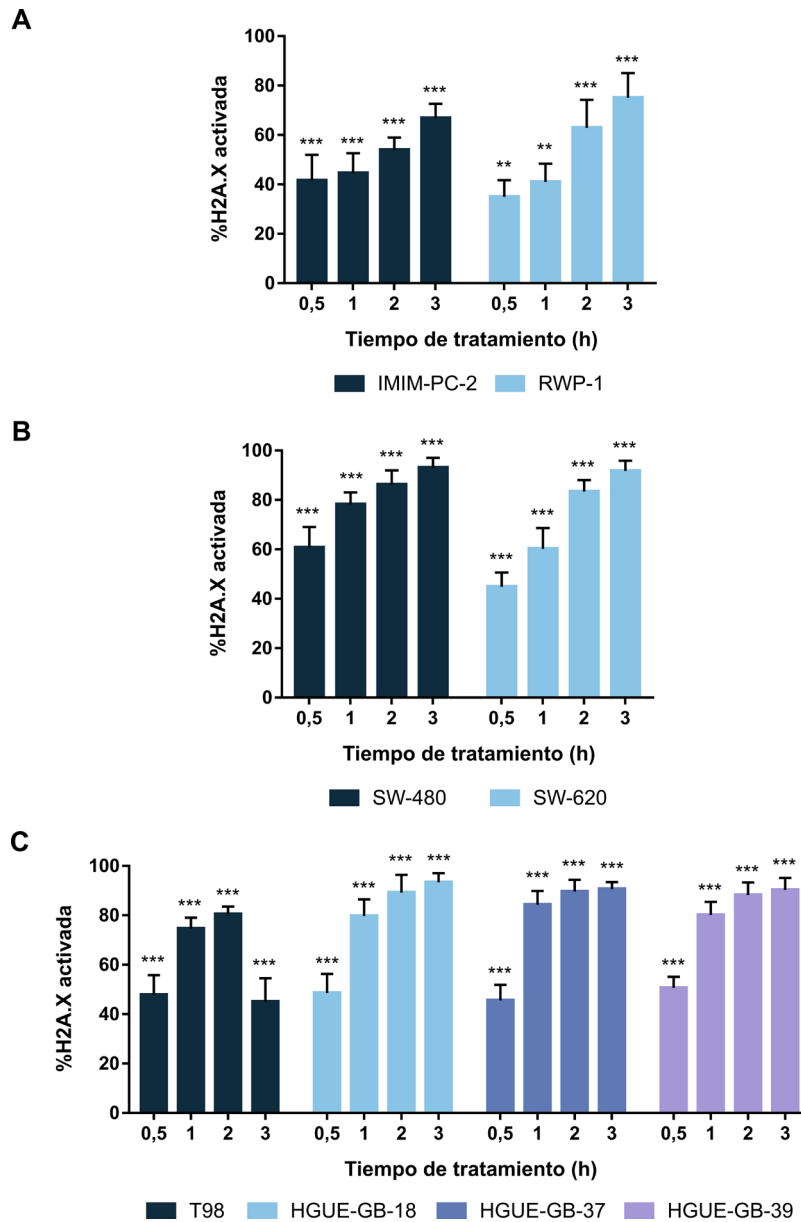
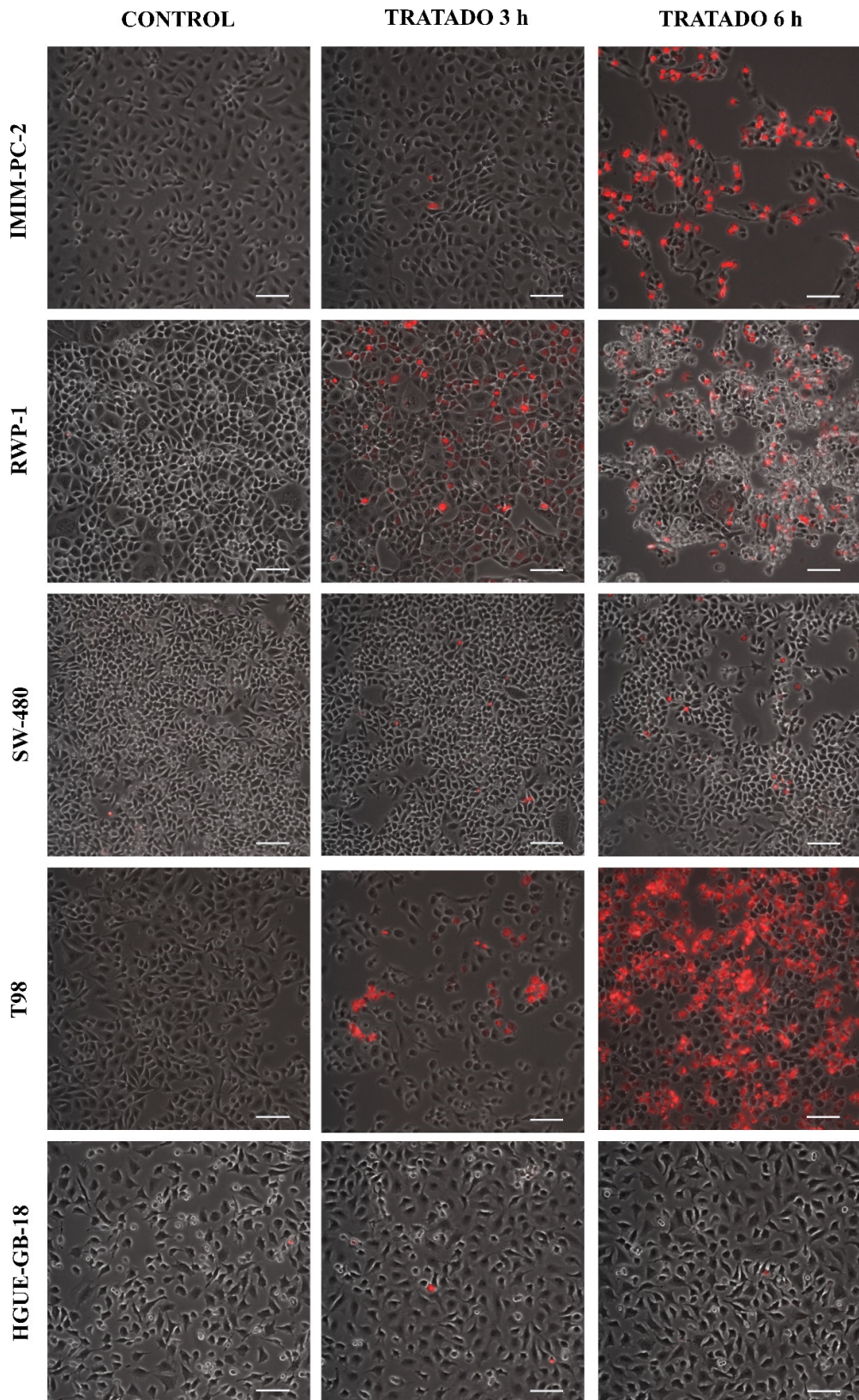


Figura 46. Aumento de la histona H2A.X activada tras el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y glioblastoma (C) se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante tiempos comprendidos entre 0,5-3 horas. Finalizados los tiempos de tratamiento, se utilizó el kit de detección dual de la histona H2A.X y el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de H2A.X fosforilada \pm SD tras haberle restado el porcentaje en el control ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Resultados



NOTA: El pie de figura se encuentra en la página siguiente.

Figura 47. Marcaje con yoduro de propidio tras 3 y 6 horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, T98 y HGUE-GB-18 se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 3 y 6 horas. A continuación, se incubaron durante 30 minutos en oscuridad con una solución que contenía yoduro de propidio y se realizaron las fotografías con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse TE2000-U equipado con una cámara digital Nikon DS-1QM. Barras de escala: 100 μ m.

Por otra parte, se evaluó la rotura de la membrana plasmática con un kit de citotoxicidad basado en la actividad de la enzima LDH en el exterior celular. En este caso, las células se trataron con las mismas concentraciones de CLyTA-DAO y D-Ala durante 6 horas (**Figura 48**). Al medir la actividad de la LDH en el medio extracelular, el mayor aumento se produjo en las líneas celulares RWP-1 de CP, SW-620 de CCR y T98 de GBM, aunque también fue significativo el aumento observado en la línea celular SW-480 (**Figura 48**). Ni en IMIM-PC-2 de CP, ni en las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM se observó un aumento significativo de la actividad de la LDH en el exterior celular tras 6 horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala (**Figura 48**).

Los resultados de la **Figura 48** corroboran las imágenes observadas en la **Figura 47**, con excepción del resultado observado en la línea celular IMIM-PC-2. Puesto que la rotura de la membrana plasmática es muy evidente con las imágenes tomadas tras el marcaje con yoduro de propidio, una posible explicación sería que esta línea celular tenga inhibida la expresión de la enzima LDH.

Además de los daños a nivel de ADN y de membrana plasmática inducidos durante las primeras horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala, también se estudió el potencial de membrana mitocondrial. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 y SW-620 de CCR y T98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 3 y 6 horas y, a continuación, se determinó el PMM. De nuevo, en todas las líneas celulares utilizadas, se produjo un descenso significativo del PMM (**Figura 49**).

Resultados

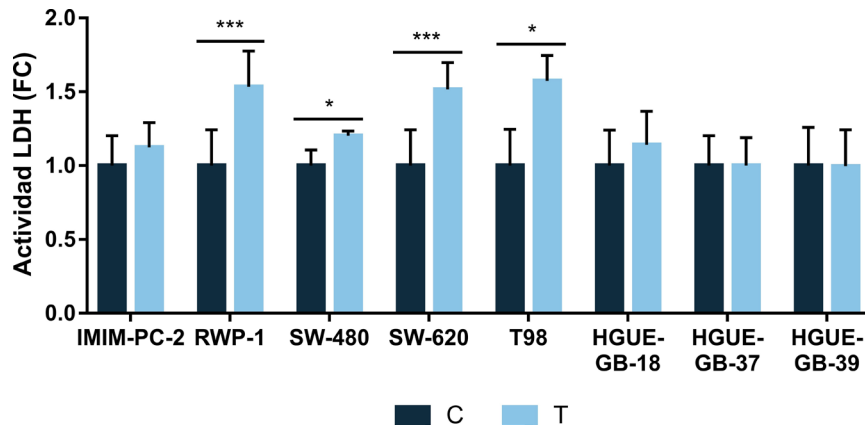


Figura 48. Actividad LDH en el medio extracelular tras 6 horas de tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, T98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 6 horas y la integridad de la membrana plasmática se estudió con el kit de detección de citotoxicidad (LDH). Se representa el incremento de la intensidad de fluorescencia \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$ y *** $< 0,001$.

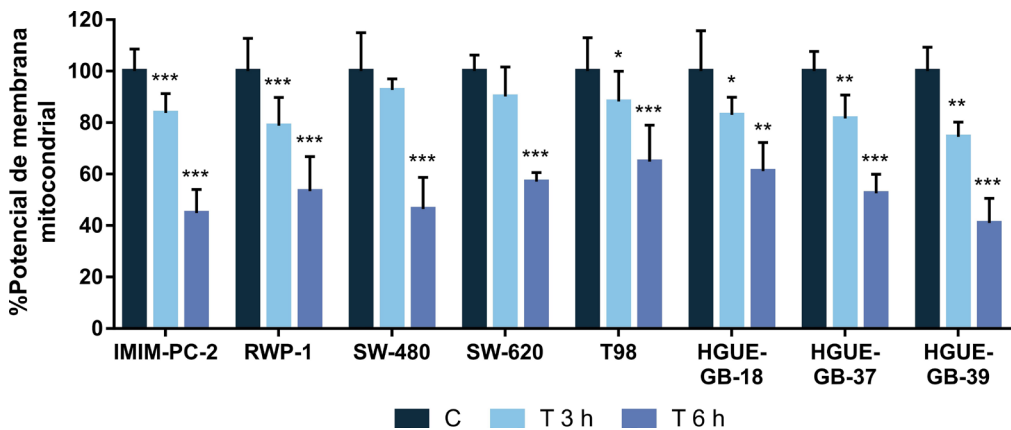


Figura 49. Estudio del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, T98, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 3 y 6 horas. Finalizados los tiempos de tratamiento, se utilizaron las sondas Mitotracker™ Red CMXRos y Mitotracker™ Green FM y se midió la fluorescencia con el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multimode. Se representa el porcentaje del potencial de membrana mitocondrial \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Una de las posibles causas que pueden explicar la despolarización de la membrana mitocondrial es la entrada de calcio en la mitocondria. Con el fin de comprobar si el calcio es necesario para que tenga lugar la muerte celular inducida por el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala, se utilizaron dos quelantes de calcio con mecanismos de acción diferentes.

El EGTA tiene una localización extracelular, mientras que el BAPTA/AM es capaz de atravesar la membrana plasmática. Ambos fueron añadidos antes que el tratamiento con CLyTA-DAO. En el caso del EGTA, se añadió 30 minutos antes y se mantuvo hasta finalizar el tratamiento. El BAPTA/AM, al ser permeable a la membrana plasmática, es capaz de quelar el calcio del exterior y del interior celular. Por ello, fue añadido una hora antes del tratamiento con CLyTA-DAO, que es tiempo suficiente para que entre a las células y, a continuación, el medio fue reemplazado por medio fresco para así restablecer el calcio extracelular, pero manteniendo los movimientos intracelulares de calcio bloqueados.

El EGTA no causó variaciones en la muerte inducida por CLyTA-DAO en ninguna de las líneas celulares testadas, mientras que el tratamiento con BAPTA/AM disminuyó entre el 70-100% de la muerte celular en RWP-1, SW-480 y SW620 (**Figura 50**). También se bloqueó significativamente la muerte celular en HGUE-GB-37, aunque en este caso el descenso fue del $34,8 \pm 12,4\%$ (**Figura 50**). En cambio, no se observaron cambios significativos en IMIM-PC-2 y HGUE-GB-39 (**Figura 50**).

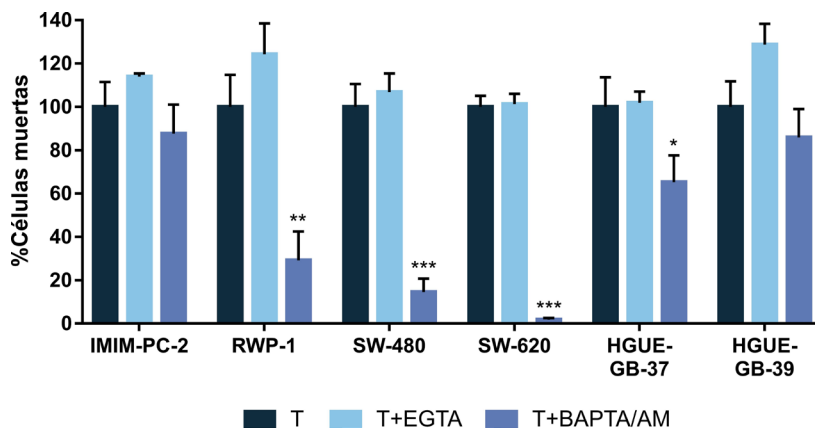


Figura 50. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala tras quelar el calcio. Las líneas tumorales IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala solo (T) o tras un pretratamiento con 100 μ M de EGTA (quelante extracelular) o 5 μ M de BAPTA/AM (quelante intracelular). El EGTA se añadió 30 minutos antes que el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala y el BAPTA/AM se añadió 1 hora antes y se retiró del medio pasado este tiempo. El tratamiento finalizó a las 24 horas y se determinó la viabilidad con el analizador celular de Muse®. Se representa el porcentaje de muerte celular \pm SD, normalizando al 100% la muerte observada con el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

4.2.2. Comparación del efecto inducido por el tratamiento con CLytA-DAO con el causado por la adición puntual de H₂O₂

La muerte celular se produce como consecuencia del estrés oxidativo generado durante la reacción catalizada por CLytA-DAO. Como subproducto de la oxidación de los D-aminoácidos se genera peróxido de hidrógeno, que induce un aumento de las ROS en el interior celular, las cuales causan daños en el ADN, en la membrana plasmática y en orgánulos como las mitocondrias. Para determinar si el efecto inducido por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala es comparable con la adición directa de H₂O₂, se analizó el efecto del H₂O₂ sobre las líneas celulares de CP, CCR y GBM.

Inicialmente, se realizaron análisis dosis-respuesta mediante MTT utilizando concentraciones de H₂O₂ comprendidas entre 50 y 600 μ M durante 72 horas. Este estudio se realizó en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, HT-29, SW-480 y SW-620 de CCR y HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42 de GBM, observándose en todas ellas un efecto antiproliferativo dependiente de la concentración de H₂O₂ (**Figura 51**).

Sin embargo, los resultados mostraron diferentes patrones de sensibilidad en comparación con los observados con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Por ejemplo, las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR son sensibles al tratamiento con CLytA-DAO con valores de IC₅₀ similares (**Tabla 9**). En cambio, al tratarlas con H₂O₂, IMIM-PC-2 y SW-620 fueron menos sensibles que RWP-1 y SW-480 (**Tabla 14**). La línea celular Hs766T de CP fue una de las más resistentes al tratamiento con H₂O₂, lo que concuerda con la resistencia observada frente a CLytA-DAO. En cambio, la línea celular HT-29 de CCR, que también es resistente al tratamiento con CLytA-DAO, fue una de las más sensibles frente al tratamiento con H₂O₂ con un valor de IC₅₀ de $67,87 \pm 2,79 \mu$ M (**Tabla 14**). Por su parte, las líneas celulares de GBM utilizadas, fueron bastante resistentes a la adición puntual de H₂O₂ y, concretamente, HGUE-GB-37 fue la línea celular más resistente de todas las utilizadas (IC₅₀: $480,0 \pm 17,74 \mu$ M) (**Tabla 14**).

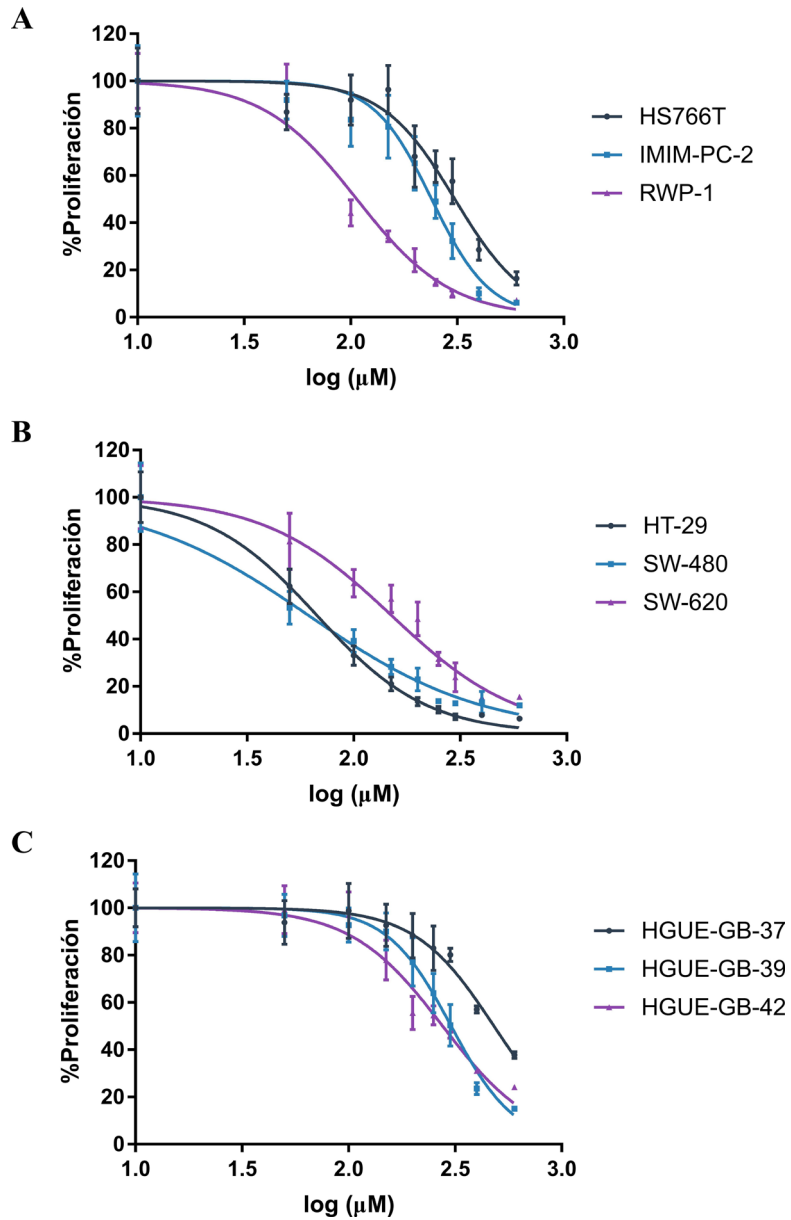


Figura 51. Efecto de H₂O₂ sobre la proliferación celular. Las líneas celulares procedentes de carcinoma de páncreas (**A**), carcinoma colorrectal (**B**) y glioblastoma (**C**) se trataron con H₂O₂ en un rango de concentraciones entre 50-600 μM durante 72 horas. Se representa el porcentaje promedio de proliferación ± SD con respecto al control (n ≥ 6).

Resultados

Origen	Línea celular	IC ₅₀ ± SD (μM)
Carcinoma de páncreas	Hs766T	308,5 ± 18,12
	IMIM-PC-2	235,8 ± 9,06
	RWP-1	108,7 ± 7,94
Carcinoma de colon	HT-29	67,87 ± 2,79
	SW-480	67,59 ± 6,81
	SW-620	159,3 ± 9,34
Glioblastoma	HGUE-GB-37	480,0 ± 17,74
	HGUE-GB-39	296,5 ± 6,92
	HGUE-GB-42	274,4 ± 14,89

Tabla 14. Valores de IC₅₀ del H₂O₂. Las líneas celulares de CP, CCR y GBM se trataron en un rango de concentraciones de H₂O₂ entre 50-600 μM durante 72 horas.

Seguidamente, se analizó la distribución de células en las distintas fases del ciclo celular tras el tratamiento con 600 μM de H₂O₂, en base a que a dicha concentración el efecto antiproliferativo fue muy similar al observado con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala. Tal y como se indica en el **apartado 4.1.2.**, el efecto inducido por CLytA-DAO y D-Ala es citotóxico, causando un aumento del porcentaje de células en la fase SubG₁, asociada con la fragmentación del ADN. Por el contrario, el tratamiento con H₂O₂ causó principalmente un efecto citostático, bloqueando el ciclo celular en la fase G₂/M y, en algunas de las líneas celulares, se observó un ligero aumento de la fase SubG₁ (**Figura 52**).

Entre las líneas celulares de CP y CCR sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO, únicamente SW-620 mostró un efecto citostático significativo, aumentando la fase G₂/M en un 49,6 ± 2,12% con respecto al control (**Figura 52B**). Curiosamente, en Hs766T de CP y HT-29 de CCR, que son las dos principales líneas celulares resistentes a CLytA-DAO, también se observó un marcado efecto citostático al ser tratadas con 600 μM de H₂O₂, con un aumento significativo de la fase G₂/M de 37,3 ± 4,6% y de 47,0 ± 1,7% con respecto al control, respectivamente (**Figura 52A,B**). Los modelos celulares de GBM mostraron un efecto menor del tratamiento con H₂O₂ en comparación con el observado con CLytA-DAO. Con 600 μM de H₂O₂ se produjo un bloqueo en la fase G₂/M en HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-42, aunque este efecto sólo fue significativo en HGUE-GB-37 (**Figura 52C**). Únicamente se produjo un aumento de la fase SubG₁ en la línea celular de GBM HGUE-GB-18, que fue significativo y muy similar al observado con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala (**Figura 52C**).

Resultados

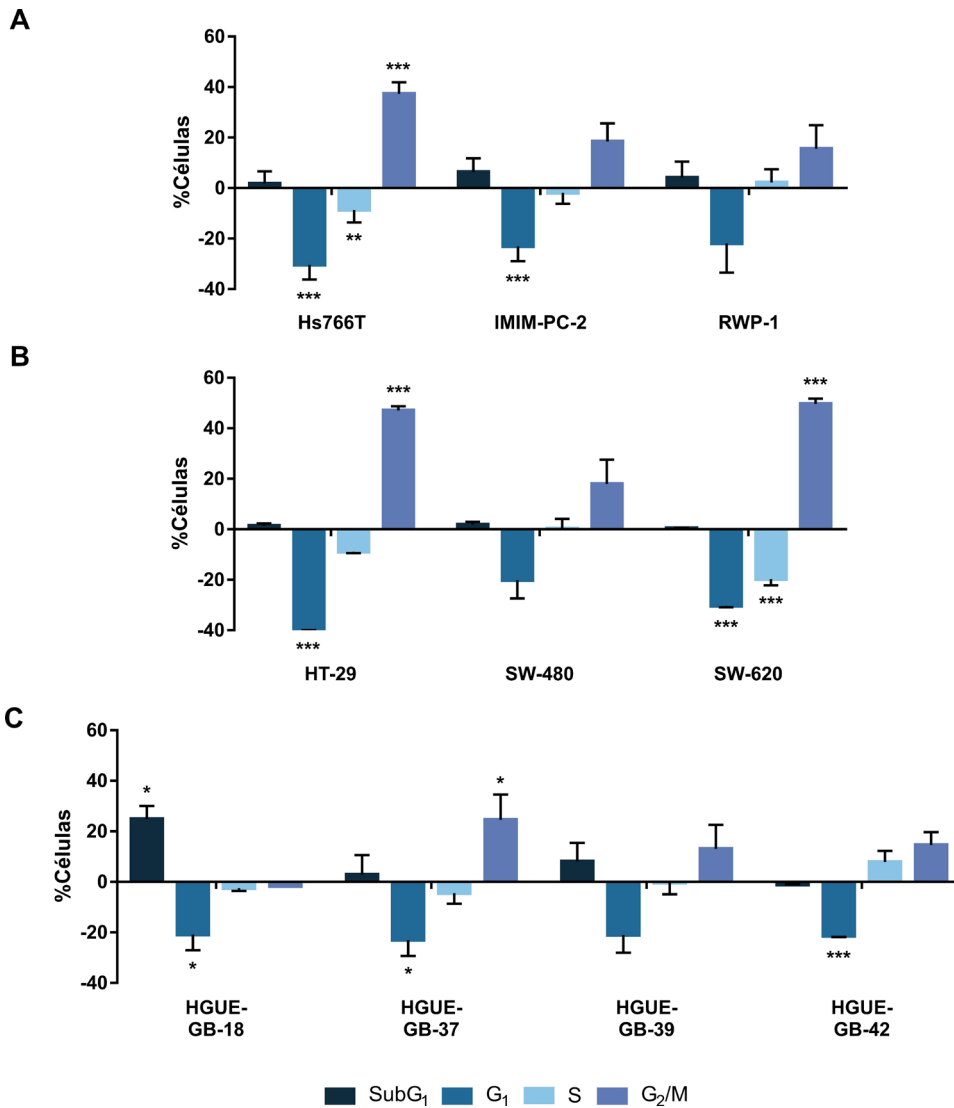


Figura 52. Efecto del tratamiento con H₂O₂ sobre el ciclo celular. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas (A), carcinoma colorrectal (B) y glioblastoma (C) se trataron con 600 μM de H₂O₂ durante 24 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular ± SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control (n ≥ 3). * indica un p-valor < 0,05, ** < 0,01 y *** < 0,001.

Con la finalidad de poder descartar el efecto citotóxico del tratamiento con H₂O₂, se repitió el estudio en algunas de las líneas celulares, pero analizando el resultado mediante un ensayo de viabilidad, que detecta la muerte celular a través de la ruptura de la membrana plasmática, en lugar de mediante la fragmentación del ADN. En todas las líneas celulares estudiadas, el porcentaje de células muertas fue inferior al 15%, siendo

las líneas celulares RWP-1 de CP y SW-480 de CCR las que sufrieron un mayor porcentaje de muerte celular (**Figura 53**).

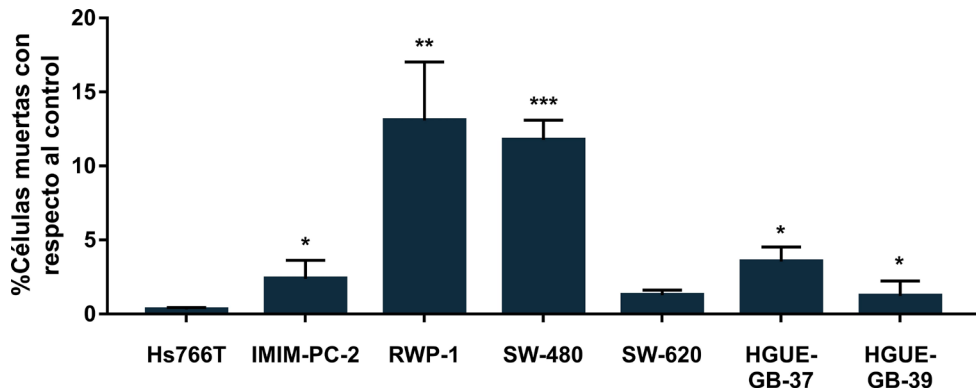


Figura 53. Efecto del tratamiento con H₂O₂ sobre la viabilidad celular. Las líneas celulares de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma se trataron con 600 μM de H₂O₂ durante 24 horas y la integridad de la membrana plasmática se analizó con el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de células muertas ± SD tras haberle restado el porcentaje de células muertas en el control (n ≥ 3). * indica un p-valor < 0,05, ** < 0,01 y *** < 0,001.

A raíz de los resultados obtenidos con el tratamiento con H₂O₂ en el ciclo celular, surgió la cuestión de si las células bloqueadas en la fase G₂/M se recuperarían y volverían a ciclar o si, por el contrario, entrarían en un proceso de muerte celular. Por ello, se repitieron los análisis del ciclo celular manteniendo el tratamiento con 600 μM de H₂O₂ durante 48 y 72 horas en dos líneas celulares de CP: IMIM-PC-2, sensible al efecto citotóxico de CLytA-DAO, y Hs766T, resistente. Mientras que en Hs766T se mantuvo el efecto citostático inducido por H₂O₂ durante las 48 y 72 horas de tratamiento, en IMIM-PC-2 sí que se llegó a observar un aumento significativo de la fase SubG₁ tras 72 horas de tratamiento (**Figura 54**). En cualquier caso, con ninguno de los tiempos estudiados se alcanzó el nivel de citotoxicidad inducido por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.

Resultados

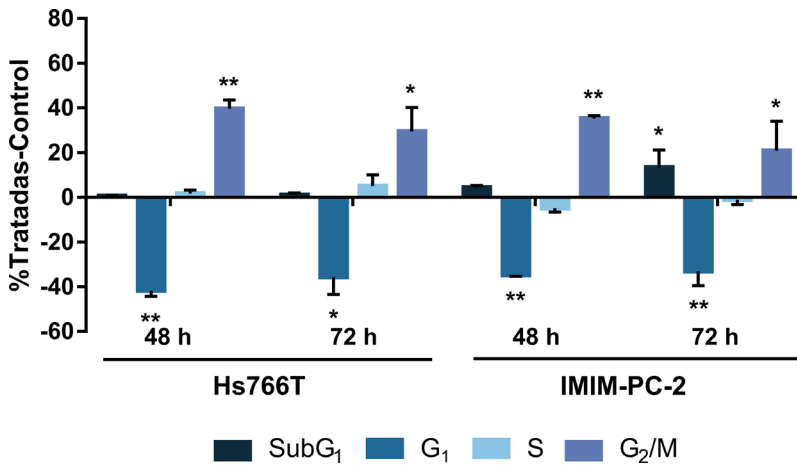


Figura 54. Efecto del tratamiento con H₂O₂ durante 48 y 72 horas sobre el ciclo celular de las líneas celulares Hs766T, e IMIM-PC-2. Las células fueron tratadas con 600 μ M de H₂O₂ durante 48 y 72 horas y el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular se analizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD tras haberle restado el porcentaje de células en el control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

Uno de los motivos que podrían explicar las diferencias observadas entre el efecto de la enzima CLyTA-DAO y el tratamiento con H₂O₂ es que, en el primero de los casos, el aumento de las ROS es progresivo y su producción se mantiene durante el tiempo en el que la enzima está activa. La adición puntual de H₂O₂ en cambio, generaría un incremento de las ROS agudo, que desaparecería durante las primeras horas del tratamiento. Para corroborarlo, se analizó el aumento intracelular de las ROS tras la adición de 600 μ M de H₂O₂, utilizando tiempos cortos de tratamiento comprendidos entre 20 minutos y 2 horas. Este análisis se realizó en las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 de CCR y HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM utilizando las mismas condiciones que en el ensayo con CLyTA-DAAO.

En la línea celular IMIM-PC-2 se produjo un aumento máximo de las ROS de 5,45 \pm 0,64 veces con respecto al control tras 40 minutos de tratamiento y, a partir de ahí los niveles de ROS fueron descendiendo (**Figura 55**). El resultado en la línea celular RWP-1 fue similar, aunque el máximo se observó en los primeros 20 minutos y fue de 2,73 \pm 0,93 veces con respecto al control (**Figura 55**). En ambas líneas celulares de CP, el aumento de las ROS se produjo más rápidamente y fue más elevado con la adición de H₂O₂ que con el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. En el caso de SW-480 de CCR, no se llegó a producir

ese descenso de ROS con los tiempos de tratamiento utilizados y, además, el máximo nivel de ROS se produjo tras 2 horas de tratamiento y fue de $3,69 \pm 0,69$ con respecto al control (**Figura 55**), un valor muy similar al observado con CLytA-DAO y D-Ala ($3,51 \pm 0,55$). Por último, en las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM, al igual que sucedió con las de CP, se observó el valor máximo de ROS tras 40 y 20 minutos, respectivamente, seguido por un descenso (**Figura 55**). En el caso de HGUE-GB-37 ese máximo fue superior al producido con el tratamiento con CLytA-DAO, en HGUE-GB-39, los valores máximos fueron muy similares, aunque se produjeron más rápidamente con el H_2O_2 . Por lo tanto, a excepción de la línea celular SW-480, los resultados obtenidos confirmaron que la cinética de la producción de ROS inducida por el H_2O_2 es diferente a la que se produce con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala.

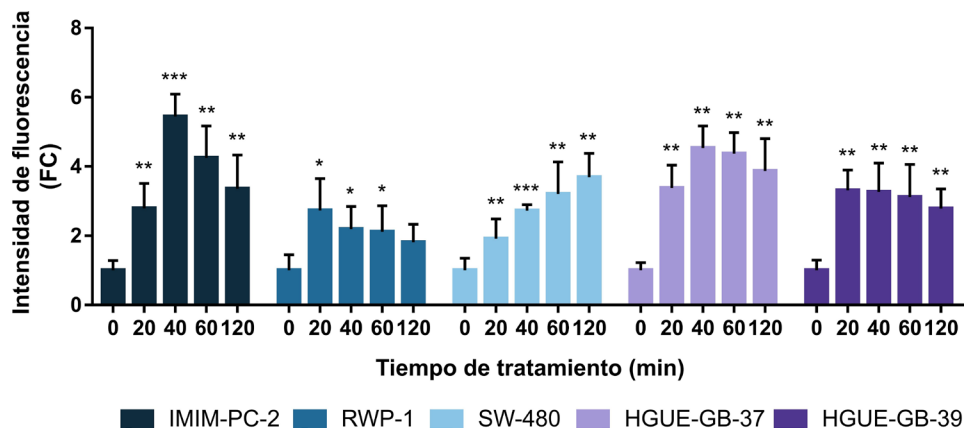


Figura 55. Aumento de las ROS tras el tratamiento con H_2O_2 . Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de carcinoma de páncreas, SW-480 de carcinoma colorrectal y HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de glioblastoma se trataron con $600 \mu M$ de H_2O_2 durante tiempos comprendidos entre 20-120 minutos. Para cada uno de los tiempos, se añadió un control sin tratamiento y, tanto controles como tratados contuvieron la sonda DCFH₂-DA durante el mismo tiempo. Finalizados los tiempos de tratamiento, se midió la intensidad de fluorescencia con el lector de placas POLARstar Omega. Se representa el incremento de la intensidad de fluorescencia \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

4.2.3. Evaluación de diferentes vías de muerte celular mediante inhibidores específicos

Una vez determinados los daños causados por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala durante las primeras horas de tratamiento, se evaluó el tipo de muerte celular que se

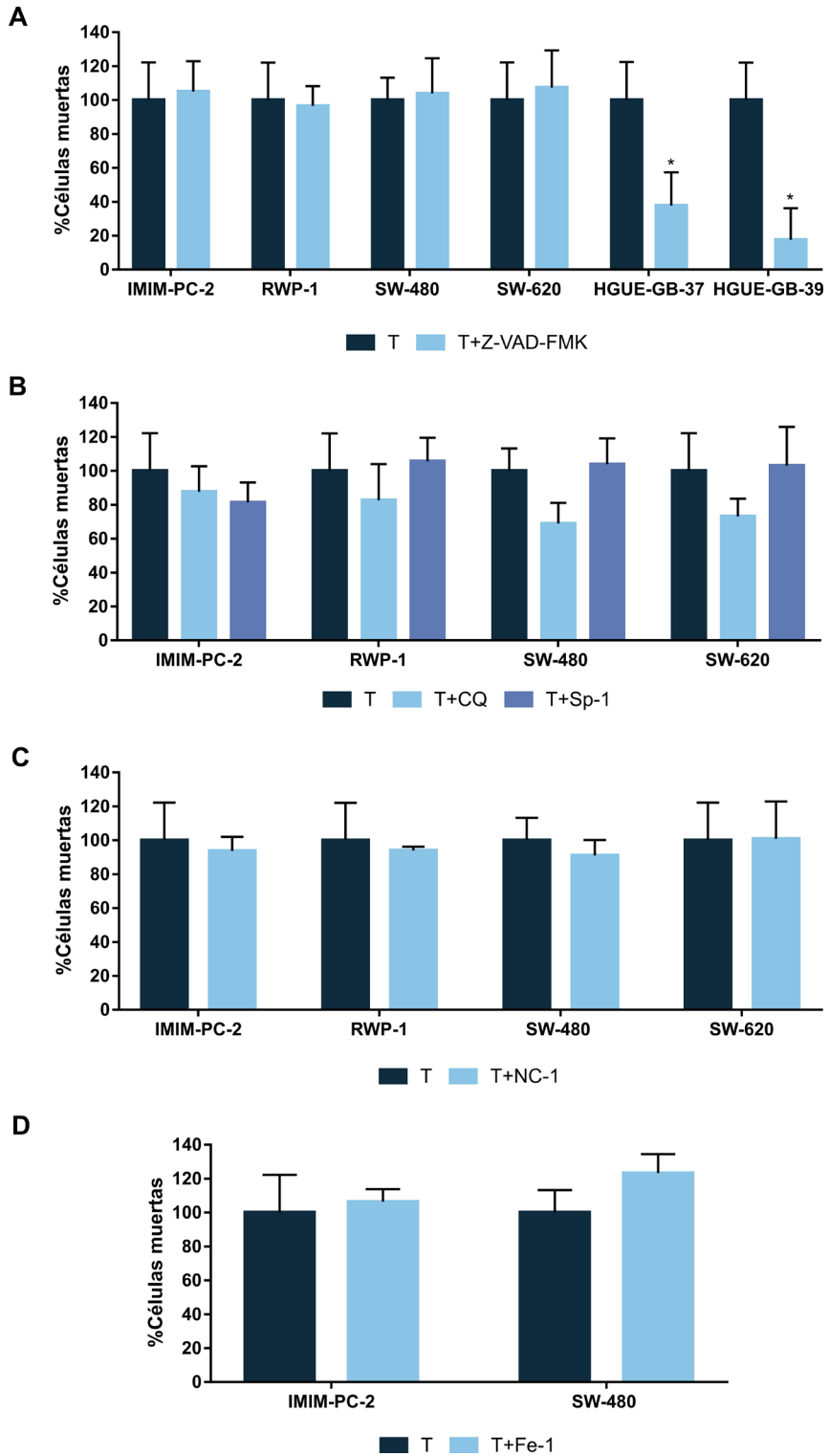
desencadenaba. En primer lugar, se utilizó el Z-VAD-FMK, un inhibidor general de caspasas capaz de bloquear la muerte por apoptosis. El Z-VAD-FMK (25 μ M) se añadió a las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 y SW-620 de CCR y HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM 30 minutos antes de tratarlas con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Tras finalizar el tratamiento, el inhibidor de caspasas únicamente causó un bloqueo significativo de la muerte celular inducida por CLyTA-DAO en las líneas celulares de GBM (**Figura 56A**).

Tras no observar ningún efecto del inhibidor de caspasas en las líneas tumorales de páncreas y colon, se repitió el experimento utilizando dos inhibidores de autofagia, la CQ y la Sp-1. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR fueron tratadas con CQ (10 μ M) o Sp-1 (10 μ M) y, 30 minutos después, se les añadió la enzima CLyTA-DAO junto con la D-Ala durante 24 horas. Tras el análisis de viabilidad, con la CQ se observó un ligero descenso de la muerte celular causada por el tratamiento en todas las líneas tumorales, aunque en ningún caso esta variación fue significativa. Finalmente, la autofagia quedó totalmente descartada al observar que el otro inhibidor de autofagia utilizado, la Sp-1, no produjo ninguna variación de la muerte celular (**Figura 56B**).

Descartadas la muerte celular apoptótica y la autofagia, se ensayó un inhibidor de la necroptosis, la NC-1. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR se trataron con NC-1 (20 μ M), 30 minutos antes de añadir el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. Sin embargo, con el inhibidor de la necroptosis tampoco se observaron variaciones en la muerte inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO (**Figura 56C**). Por lo tanto, también se descartó la necroptosis como el mecanismo de muerte celular inducido por CLyTA-DAO en las líneas tumorales de páncreas y colon.

Por último, se probó la Fe-1 (10 μ M), un inhibidor de la muerte por ferroptosis, en una línea tumoral de CP (IMIM-PC-2) y en otra de CCR (SW-480), aunque tampoco generó cambios significativos en la muerte celular inducida por el tratamiento (**Figura 56D**).

Resultados



NOTA: El pie de figura se encuentra en la página siguiente.

Figura 56. Análisis del tipo de muerte celular inducido por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Las células se trataron durante 24 horas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo (T) o tras haber añadido 30 minutos antes, un pretratamiento con un inhibidor de la apoptosis, autofagia, necroptosis o ferroptosis. **(A)** Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 y SW-620 de CCR y HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM fueron pretratadas con 25 μ M de Z-VAD-FMK, un inhibidor de caspasas general. **(B)** Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR fueron pretratadas con 10 μ M de CQ o Sp-1, inhibidores de la autofagia. **(C)** Las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR fueron pretratadas con 20 μ M de NC-1, un inhibidor de la necroptosis. **(D)** Las líneas celulares IMIM-PC-2 de CP y SW-480 de CCR fueron pretratadas con 10 μ M de Fe-1, un inhibidor de la ferroptosis. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el porcentaje de muerte celular \pm SD, normalizando al 100% la muerte observada con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$.

4.2.4. Análisis de la muerte celular apoptótica en las líneas tumorales de glioblastoma

En el apartado anterior quedó demostrado que un inhibidor general de caspasas bloquea significativamente la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO en las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM. Este resultado sugiere que, en estas líneas celulares, posiblemente el mecanismo de muerte celular sea apoptótico. Con el fin de seguir profundizando en ello, se trataron las células con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas, y se determinó el porcentaje de células en apoptosis temprana. Para ello, se utilizaron dos marcadores, la anexina V, que tiene afinidad por la PS y el 7-AAD, un marcador fluorescente impermeable a la membrana plasmática que se une al ADN. La traslocación de la PS hacia el exterior de la membrana plasmática es uno de los procesos característicos que ocurre en el inicio de la apoptosis, mientras que la ruptura de la membrana se produce al final del proceso apoptótico. De este modo, las células positivas para Anexina V y negativas para 7-AAD se contabilizarían como apoptosis temprana, mientras que las que fueran positivas para Anexina V y 7-AAD, se corresponderían con células en apoptosis tardía o necrosis.

En todas las líneas celulares de GBM utilizadas, se observó un aumento significativo del porcentaje de células en apoptosis temprana, indicando que antes de tener lugar la ruptura de la membrana plasmática se produjo la externalización de la PS característica de la muerte celular apoptótica (**Figura 57**).

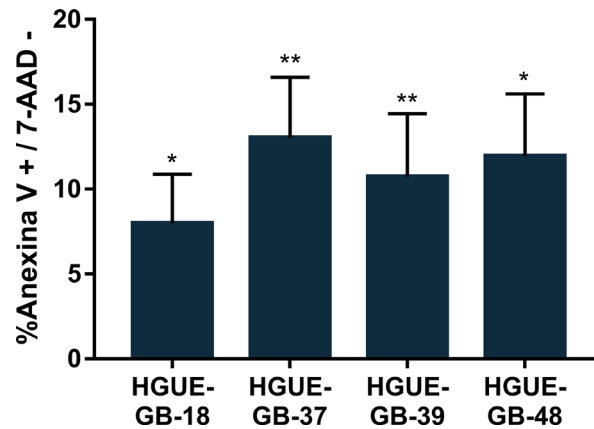


Figura 57. Evaluación de la apoptosis a través de la Anexina V y el 7-AAD tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-48 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas y, para el estudio de la apoptosis, se utilizó el kit de Anexina V y muerte celular junto con el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de células en apoptosis temprana \pm SD tras haberle restado el porcentaje en el control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

Una vez confirmada la muerte celular apoptótica, el siguiente paso consistió en averiguar la ruta de señalización que activa este tipo de muerte. En el **apartado 4.2.1. (Figura 49)** se comprobó que, durante las primeras horas del tratamiento con CLytA-DAO, disminuía el PMM en las líneas celulares de GBM. Esta característica es propia de la apoptosis intrínseca que, además, se activa normalmente por la acumulación intracelular de calcio, daño en el ADN y estrés oxidativo. Sin embargo, existe la posibilidad de que la caspasa 8 corte a Bid mediante la vía extrínseca, induciendo la inserción de Bax en la membrana mitocondrial, lo que produciría la liberación de proteínas mitocondriales, que despolarizarían la membrana mitocondrial. Con el propósito de estudiar esta opción, las células se trataron con un inhibidor de la caspasa 8 (IC8, 20 μ M) y un péptido inhibidor de Bax (BIP-v5, 200 μ M). De nuevo, los inhibidores fueron añadidos 30 minutos antes del tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala y se mantuvieron durante 24 horas hasta haber finalizado el tratamiento.

En la línea celular HGUE-GB-37 se produjo un descenso de la muerte celular inducida por CLytA-DAO del $26,7 \pm 5,3\%$ tras haber la adición del IC8, aunque dicho descenso no fue significativo (**Figura 58**). Por el contrario, sí que se observó un descenso significativo de la muerte celular del $54,9 \pm 21,8\%$ tras la inhibición de Bax, con respecto

al tratamiento original con CLyTA-DAO y D-Ala (**Figura 58**). En el caso de la línea celular HGUE-GB-39, la muerte celular no varió con ninguno de los dos inhibidores (**Figura 58**). Este resultado parece indicar que, efectivamente la apoptosis se activa mediante la vía intrínseca, aunque en algunos casos se produce de forma dependiente de Bax, mientras que en otros es independiente.

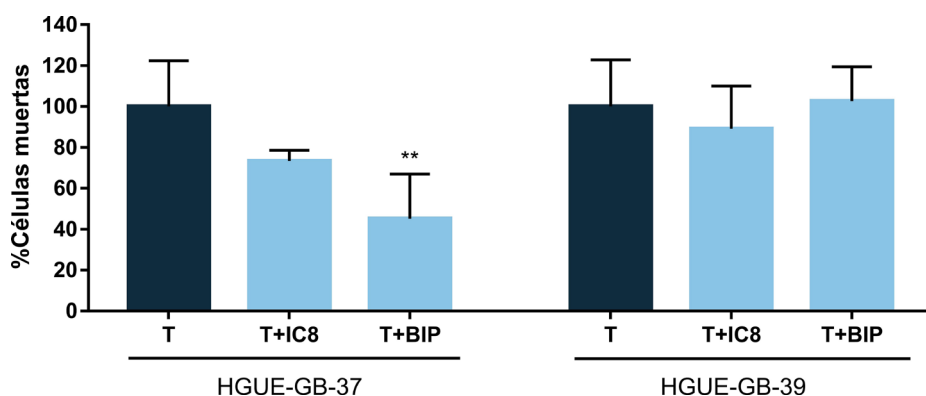


Figura 58. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala tras inhibir la caspasa 8 y Bax. Las líneas tumorales HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala solo (T) o tras un pretratamiento con 20 μ M de IC8 o con 200 μ M de BIP. Los inhibidores se añadieron 30 minutos antes que el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala y se mantuvieron hasta finalizado el tratamiento, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el porcentaje de muerte celular \pm SD, normalizando al 100% la muerte observada con el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$.

Con el objetivo de confirmar que CLyTA-DAO induce una apoptosis intrínseca, ya sea de forma dependiente o independiente de Bax, se realizó una inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo específico frente a AIF y los resultados se analizaron mediante microscopía confocal. Las dos líneas celulares utilizadas, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39, mostraron una traslocación de AIF al núcleo tras 6 horas de tratamiento con CLyTA-DAO (**Figura 59A**). Al cuantificar la traslocación mediante densitometría se observó que, en ambas líneas celulares, el incremento de fluorescencia verde en los núcleos fue significativo (**Figura 59B**). Estos resultados confirmaron que en las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM, el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala induce la activación de la ruta intrínseca de apoptosis.

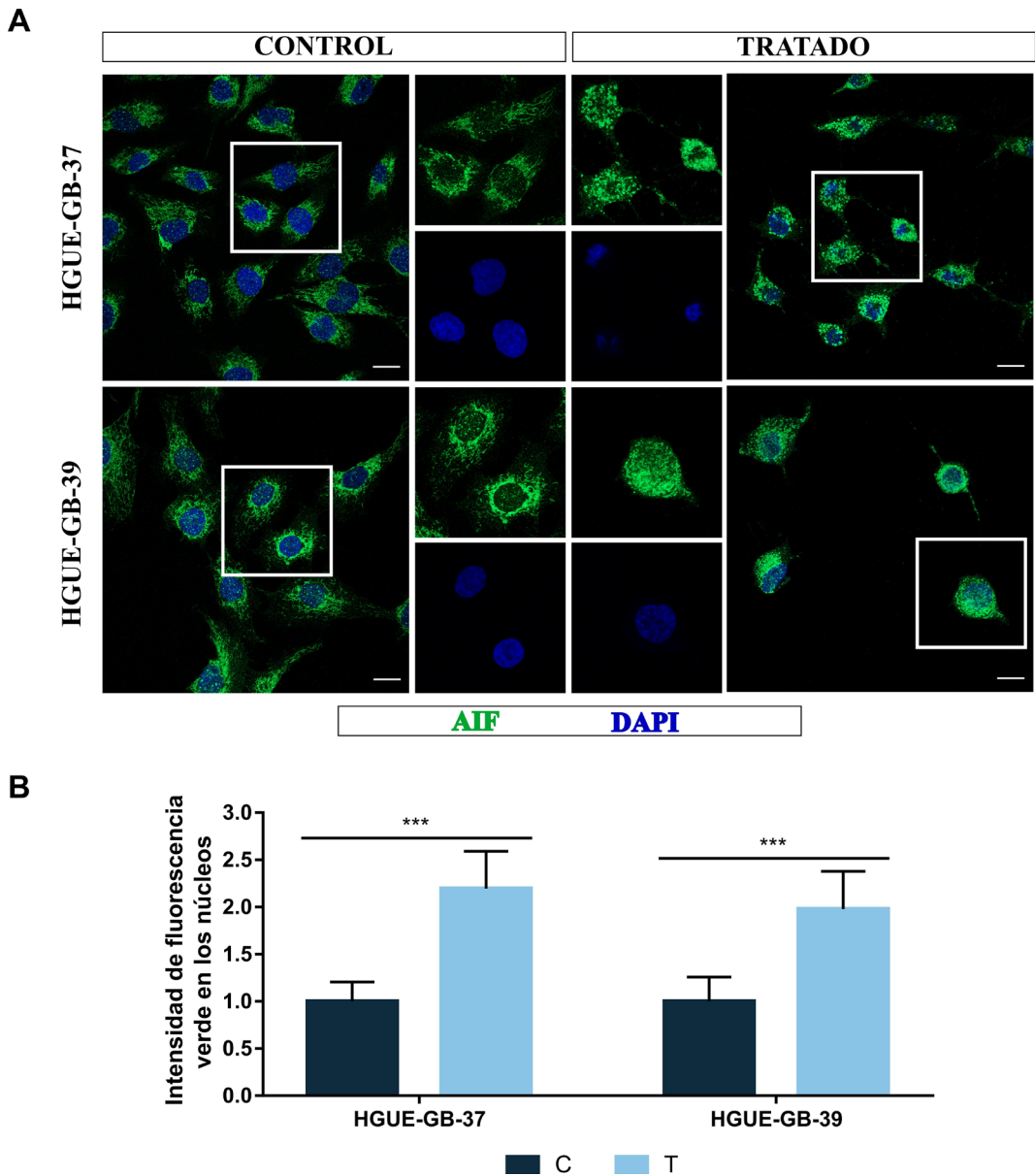


Figura 59. Localización de AIF tras el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 6 horas. A continuación, se realizó la inmunocitoquímica con un anticuerpo frente a AIF (verde), marcando los núcleos con DAPI (azul) y las células se fotografiaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2. **(A)** Fotografías tomadas en ambas líneas celulares, control y tratadas. Las imágenes centrales muestran una amplificación del recuadro blanco. Barras de escala, 20 μ M. **(B)** Densitometría de los niveles de AIF en los núcleos de las células control (C) y tratadas con ClytA-DAO y D-Ala (T). Los valores representan la intensidad de fluorescencia verde en los núcleos \pm SD normalizada con la observada en el control. *** indica un p-valor < 0,001.

4.2.5. Estudio de la muerte celular por *parthanatos* en las líneas tumorales de páncreas y colon

En conjunto, los resultados obtenidos en el **apartado 4.2.1.** indican que, en las líneas tumorales de CP y CCR, el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala aumenta las ROS en el interior celular (**Figura 45**), generando daños a nivel de ADN (**Figura 46**) y de la membrana plasmática (**Figura 47, Figura 48**) y disminuye el potencial de la membrana mitocondrial (**Figura 49**). Además, se observó que en la mayoría de estas líneas celulares la muerte es dependiente de la presencia de calcio en el interior celular (**Figura 50**).

Estos datos junto al hecho de que ninguno de los inhibidores de muerte celular utilizados bloqueó la muerte celular inducida por CLytA-DAO (**Figura 56**), sugerían una muerte celular similar a necrosis inducida por TPM. Sin embargo, existía la posibilidad de que el tipo de muerte celular inducido fuera *parthanatos*. Esta forma de muerte celular está relacionada con el estrés oxidativo y con un gran aumento del daño en el ADN, que provoca la hiperactivación de PARP-1, resultando en la acumulación de PAR en el citosol. Otras características de este tipo de muerte celular son: la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo, la salida de calcio del RE al citosol y posterior entrada a la mitocondria causando la despolarización de la membrana mitocondrial y el colapso energético.

El primer paso para comprobar la presencia de este tipo de muerte celular fue analizar las variaciones en la muerte inducida por CLytA-DAO tras utilizar un inhibidor de PARP-1 (DPQ) en las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 y SW-620 de CCR. Tanto en RWP-1 como en SW-480 y SW-620 se observó una inhibición significativa de la muerte inducida por el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM D-Ala (**Figura 60**). En cambio, en IMIM-PC-2 no se observaron variaciones de la muerte celular tras utilizar el DPQ (**Figura 60**).

Resultados

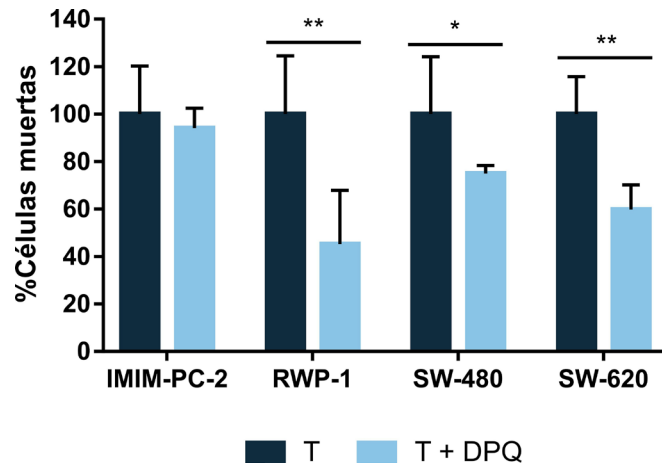
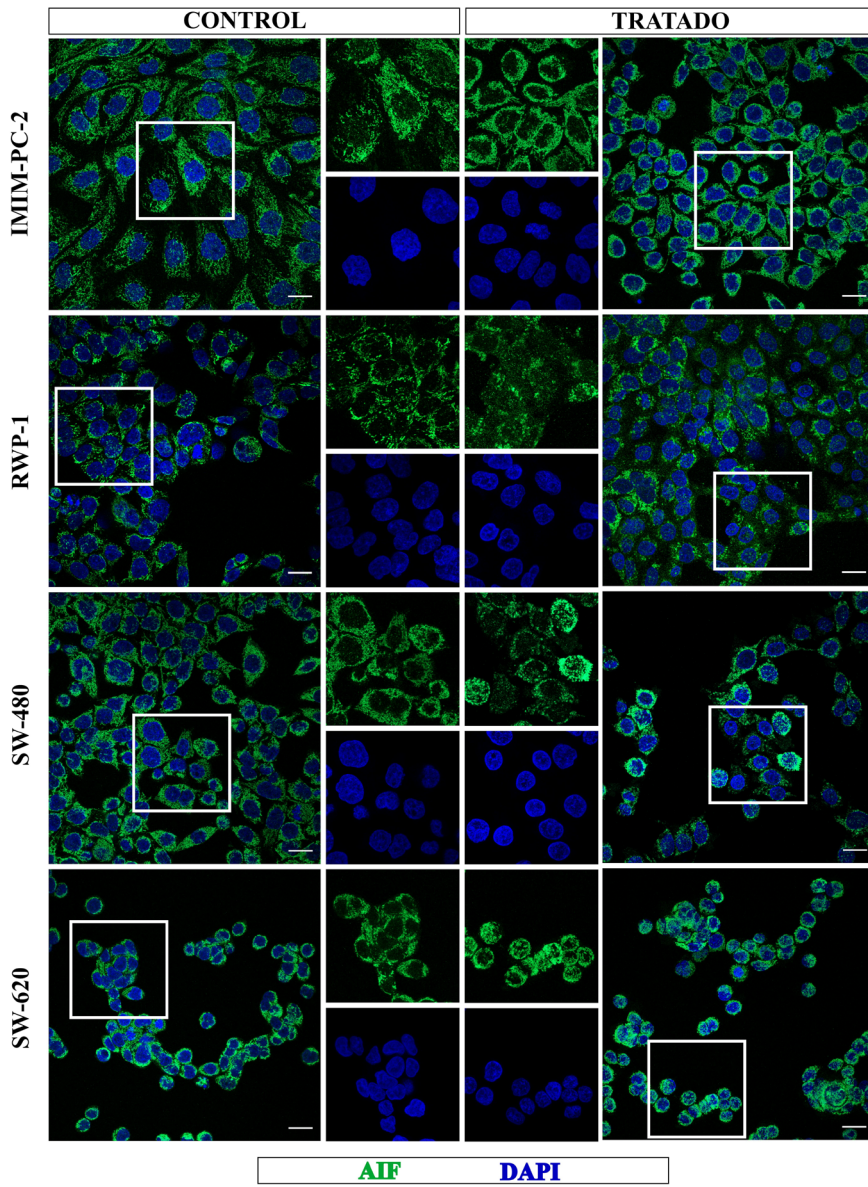


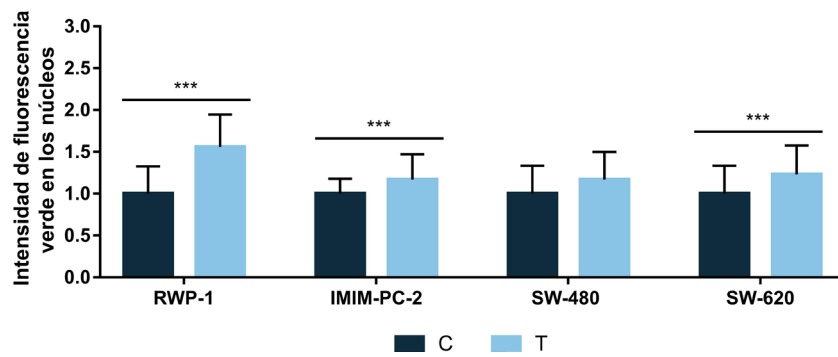
Figura 60. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras inhibir PARP-1. Las líneas tumorales IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480 y SW-620 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento con 10 μ M de DPQ, un inhibidor de PARP-1. El inhibidor se añadió 30 minutos antes que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala y se mantuvo hasta finalizado el tratamiento, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el porcentaje de muerte celular \pm SD, normalizando al 100% la muerte observada con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

A continuación, se estudió la localización de AIF en las mismas líneas celulares con y sin tratar con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 6 horas. Los mayores niveles de AIF en el núcleo tras el tratamiento, se observaron en RWP-1, seguidos de SW-620 e IMIM-PC-2, mientras que en SW-480 no se llegó a observar un aumento significativo de la fluorescencia verde en el núcleo (**Figura 61A, B**). En cualquier caso, la entrada de AIF en el núcleo tras el tratamiento fue más sutil que la observada en las líneas celulares de GBM (**Figura 59**). Cabe destacar que, en las líneas celulares en las que se observó una baja entrada de AIF al núcleo, se pudo apreciar una acumulación de la fluorescencia verde en la región perinuclear (**Figura 61A**). Es posible que, en esas líneas celulares, sea necesario un tiempo más largo de tratamiento para poder apreciar la entrada de AIF al núcleo o que simplemente se quede acumulado en la región perinuclear. Los resultados obtenidos hasta el momento únicamente parecen sugerir que CLytA-DAO induce la muerte celular por *parthanatos* en RWP-1 de CP.

A



B



NOTA: El pie de figura se encuentra en la página siguiente.

Figura 61. Localización de AIF tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480 y SW-620 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 6 horas. A continuación, se realizó la inmunocitoquímica con un anticuerpo frente a AIF (verde), marcando los núcleos con DAPI (azul) y las células se fotografiaron con un microscopio confocal Leica TCS SP2. **(A)** Fotografías tomadas en ambas líneas celulares, control y tratadas. Las imágenes centrales muestran una ampliación del recuadro blanco. Barras de escala, 20 μ M. **(B)** Densitometría de los niveles de AIF en los núcleos de las células control (C) y tratadas con CLytA-DAO y D-Ala (T). Los valores representan la intensidad de fluorescencia verde en los núcleos \pm SD normalizada con la observada en el control. *** indica un p-valor < 0,001.

4.2.6. Participación de la ruta de señalización de las MAPKs en el efecto de CLytA-DAO

Tras haber determinado que el mecanismo de muerte celular inducido por CLytA-DAO era una apoptosis intrínseca en las líneas celulares de GBM y un tipo de necrosis regulada dependiente tanto de la movilización de calcio como de la despolarización de la membrana mitocondrial en las líneas celulares de CP y CCR, era necesario estudiar la posible regulación de las MAPK. Estas vías de transducción están ampliamente relacionadas tanto con la inducción de apoptosis como con la respuesta al estrés oxidativo y a los daños producidos en el ADN. De hecho, se ha demostrado que el aumento de ROS en el RE puede causar la salida de calcio e inducir la muerte celular a través de la activación de las JNK [160].

Con el objetivo de corroborar la posible participación de las MAPKs, se evaluaron los niveles de fosforilación de los principales componentes de la ruta de MAPKs (ERK, JNK y P38) durante la primera hora de tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala. Este ensayo se realizó en una línea celular sensible, IMIM-PC-2, y en otra resistente al efecto citotóxico de CLytA-DAO, Hs766T, ambas de CP.

Los niveles de activación de las ERK aumentaron significativamente tras 30 minutos de tratamiento en IMIM-PC-2, mientras que no se observaron cambios significativos en la línea celular Hs766T (**Figura 62**). Del mismo modo, 30 minutos de tratamiento fueron suficientes para observar un aumento de la fosforilación de JNK, pero esta vez en ambas líneas celulares. Sin embargo, el aumento observado en IMIM-PC-2 fue de $18,2 \pm 0,3$ veces con respecto al control mientras que en Hs766T fue de $1,7 \pm 0,3$ veces

(Figura 62). Por último, los niveles de fosforilación de P38 aumentaron en $15,7 \pm 0,6$ veces con 30 minutos de tratamiento en IMIM-PC-2, mientras que en Hs766T se produjo un descenso del 60% (Figura 62).

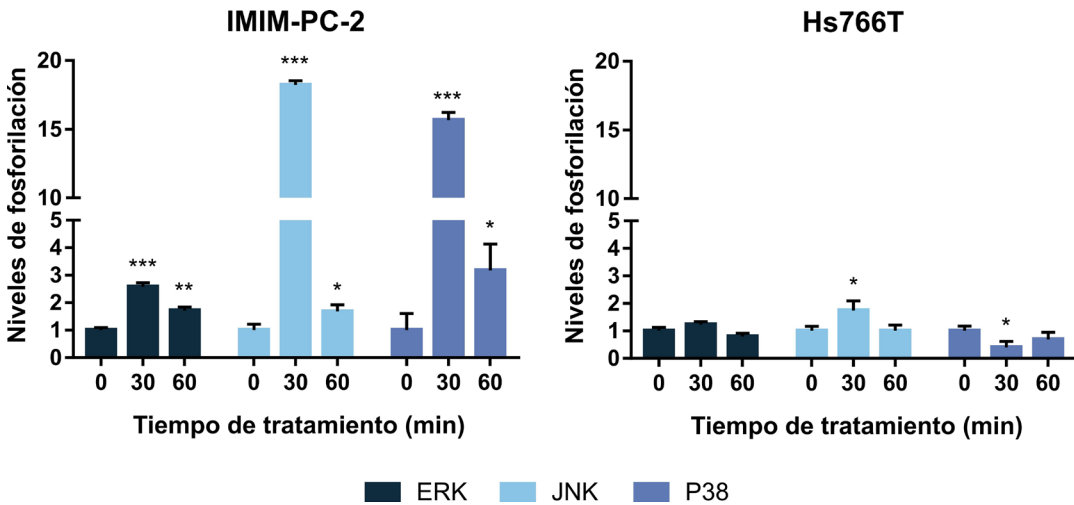


Figura 62. Niveles de fosforilación de ERK, JNK y p38 tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Las líneas celulares IMIM-PC-2 y Hs766T se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 30 minutos y 1 hora y los niveles de fosforilación de las ERK, JNK y p38 se estudiaron mediante un ensayo de ELISA. Se representa el incremento de los niveles de fosforilación \pm SD con respecto al control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Con la intención de comprobar la importancia de estos cambios a nivel celular, se utilizaron inhibidores frente a ERK (AZD6244), JNK (SP600125) o P38 (PD 169316) en varias líneas celulares sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO y se estudiaron los cambios en el porcentaje de células muertas. En este tipo de ensayo, para poder apreciar mejor las variaciones en la muerte celular se utilizó 1 U/mL de CLytA-DAO junto con 1 mM de D-Ala. Los inhibidores de ERK y JNK no produjeron cambios significativos en ninguna de las líneas celulares analizadas (Figura 63A, Figura 63B). Por el contrario, la inhibición de la fosforilación de P38, indujo un aumento en el efecto producido por el tratamiento, siendo este cambio significativo en IMIM-CP-2, SW-480, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 (Figura 63C).

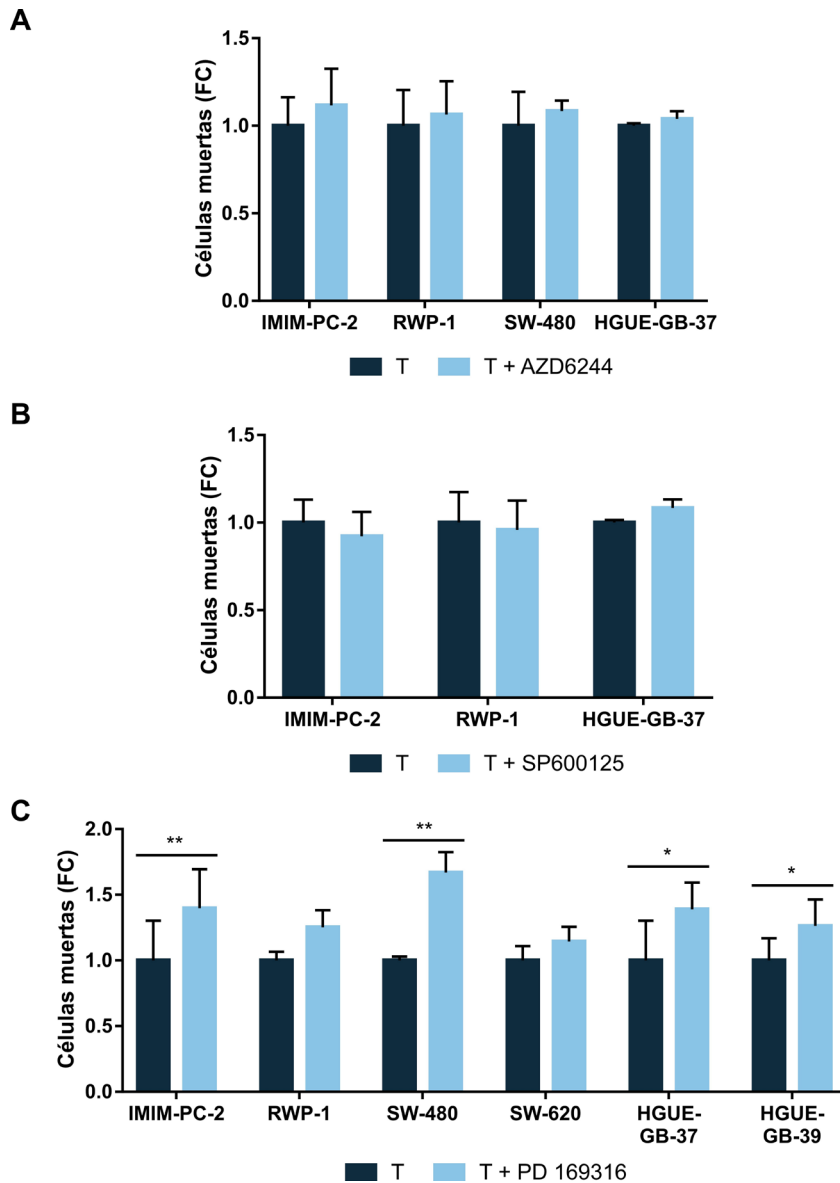


Figura 63. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala tras la inhibición de ERK, JNK y P38. (A) Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480 y HGUE-GB-37 se trataron con 1 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento con 1 μ M de AZD6244, un inhibidor de ERK. (B) Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1 y HGUE-GB-37 se trataron con 1 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento con 10 μ M de SP600125, un inhibidor de JNK. (C) Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 1 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento con 10 μ M de PD 169316, un inhibidor de p38. Los tres inhibidores se añadieron 30 minutos antes que el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala y se mantuvieron hasta finalizado el tratamiento, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

4.3. Caracterización molecular de las líneas celulares resistentes a la muerte inducida por CLytA-DAO

4.3.1. Efectos a nivel celular del tratamiento con CLytA-DAO

Con el fin de iniciar el estudio en las líneas tumorales resistentes a la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO se utilizaron tiempos cortos de tratamiento con los mismos parámetros que en las líneas celulares sensibles, para determinar y comparar el aumento de las ROS, de la fosforilación de la histona H2A.X (equivalente a los niveles de daño en el ADN) y del PMM. Estos análisis se realizaron en las líneas celulares Hs766T de CP, HT-29 de CCR y HGUE-GB-42 de GBM. Las dos primeras son totalmente resistentes a la muerte celular, mientras que HGUE-GB-42 se catalogó como moderadamente resistente.

El mayor aumento de ROS se produjo en Hs766T de CP ($2,25 \pm 0,20$), seguido de HGUE-GB-42 de GBM ($1,97 \pm 0,10$) y HT-29 de CCR ($1,36 \pm 0,06$) (**Figura 64**). Los niveles de ROS alcanzados en Hs766T fueron muy similares a los observados en las líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por el tratamiento, mientras que en HGUE-GB-42 dicho aumento fue inferior al observado en las líneas celulares de GBM sensibles. En cambio, la formación de ROS con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, apenas aumentó en HT-29.

El análisis del daño en el ADN reveló un mayor aumento de H2A.X fosforilada en HGUE-GB-42 ($93,1 \pm 5,7\%$), seguido de Hs766T ($51,5 \pm 5,9\%$) y, por último, HT-29 ($37,1 \pm 6,3\%$) (**Figura 65**). El máximo porcentaje de H2A.X activada observado en Hs766T y en HT-29, fue muy inferior a los producidos por el tratamiento con CLytA-DAO en las líneas celulares sensibles a la muerte celular de los tres tipos de tumores estudiados. En cambio, en HGUE-GB-42 el porcentaje de H2A.X fosforilada fue muy similar al observado en las líneas celulares de GBM sensibles, aunque el aumento se produjo más lentamente.

Resultados

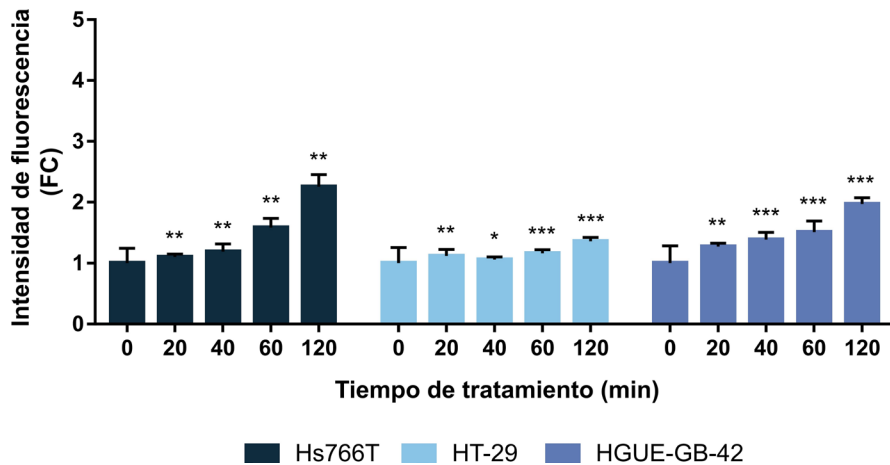


Figura 64. Aumento de las ROS tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes. Las líneas celulares Hs766T, HT-29 y HGUE-GB-42 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante tiempos comprendidos entre 20-120 minutos. Para cada uno de los tiempos, se añadió un control sin tratamiento y, tanto controles como tratados contuvieron la sonda DCFH₂-DA durante el mismo tiempo. Finalizados los tiempos de tratamiento, se midió la intensidad de fluorescencia con el lector de placas POLARstar Omega. Se representa el incremento de la intensidad de fluorescencia \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

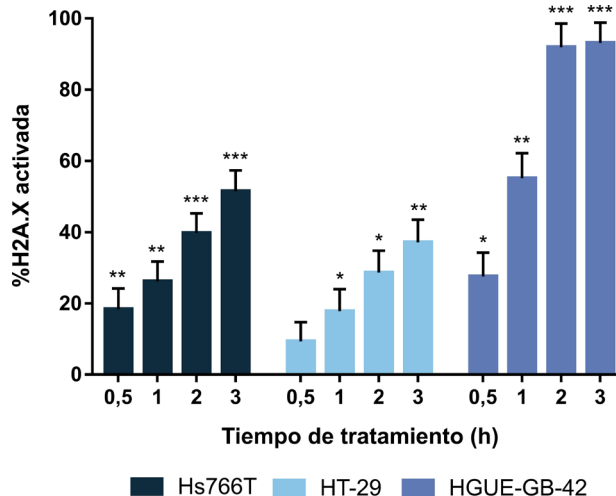


Figura 65. Aumento de la histona H2A.X activada tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes. Las líneas celulares Hs766T, HT-29 y HGUE-GB-42 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante tiempos comprendidos entre 0,5-3 horas. Finalizados los tiempos de tratamiento, se utilizó el kit de detección dual de la histona H2A.X y el analizador celular Muse®. Se representa el porcentaje de H2A.X fosforilada \pm SD tras haberle restado el porcentaje en el control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

A continuación, se estudió la despolarización de la membrana mitocondrial en las líneas celulares resistentes a la muerte inducida por CLytA-DAO. En todas las líneas celulares sensibles, la disminución del PMM osciló entre un 40-60% tras 6 horas de tratamiento (**Figura 49**). En cambio, en las líneas celulares resistentes a la muerte celular inducida por CLytA-DAO, la despolarización de la membrana mitocondrial osciló entre un 20-40% con respecto al control, siendo Hs766T la línea celular en la que se produjo el menor efecto (**Figura 66**).

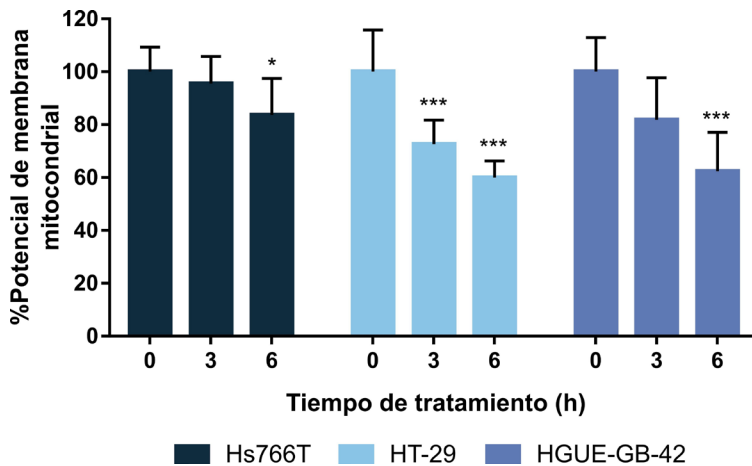


Figura 66. Estudio del potencial de membrana mitocondrial tras el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en líneas celulares total o parcialmente resistentes. Las líneas celulares Hs766T, HT-29 y HGUE-GB-42 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 3 y 6 horas. Finalizados los tiempos de tratamiento, se utilizaron las sondas Mitotracker™ Red CMXRos y Mitotracker™ Green FM y se midió la fluorescencia con el equipo Cytation 3 Cell Imaging Multimode. Se representa el porcentaje del potencial de membrana mitocondrial \pm SD con respecto al control ($n \geq 6$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

La caracterización de los mecanismos de resistencia se focalizó en Hs766T y HT-29, puesto que eran las más resistentes a la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO. Al estudiar las vías de las MAPKs, se observó que al inhibir la MAPK P38, relacionada con la respuesta al estrés, aumentaba significativamente la muerte celular inducida por CLytA-DAO en algunas de las líneas celulares sensibles (**Figura 63C**). En base a esto, se decidió determinar si el inhibidor de p38 podría sensibilizar, al menos parcialmente, a las líneas celulares resistentes a la muerte celular inducida por CLytA-DAO. Las líneas celulares Hs766T y HT-29 se trataron con el inhibidor de P38 junto con

2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala. Aunque en ambas líneas celulares aumentó la muerte celular inducida por CLyTA-DAO, el efecto únicamente fue significativo en Hs766T de CP, mostrando un aumento de $1,65 \pm 0,18$ veces con respecto al control (**Figura 67**).

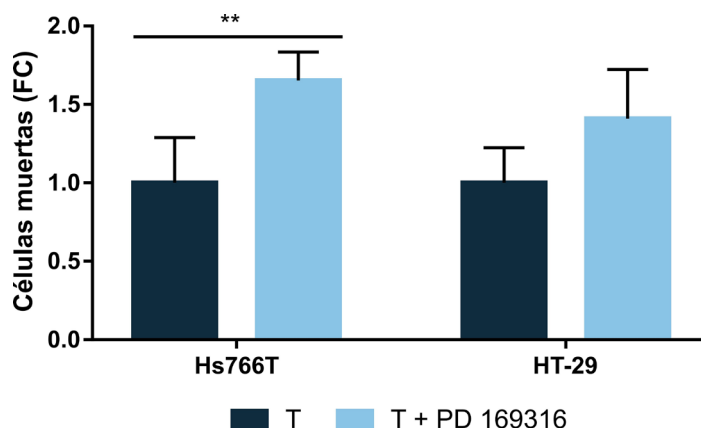


Figura 67. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala tras inhibir P38. Las líneas celulares Hs766T y HT-29 se trataron con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento con 10 μ M de PD 169316, un inhibidor de p38. El inhibidor se añadió 30 minutos antes que el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala y se mantuvo hasta finalizado el tratamiento, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse®. Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$.

4.3.2. Evaluación del mecanismo de resistencia al efecto citotóxico inducido por CLyTA-DAO en Hs766T de carcinoma de páncreas

En conjunto, los datos obtenidos indicaban que tras el tratamiento con CLyTA-DAO en la línea celular Hs766T, aumentaban tanto los radicales libres (**Figura 64**) como el daño en el ADN (**Figura 65**). El aumento de los radicales libres fue similar entre Hs766T y el resto de las líneas celulares sensibles (**Figura 44**), mientras que el porcentaje de histona H2A.X fosforilada no llegaba a alcanzar los niveles observados en las líneas celulares sensibles (**Figura 45**). Sin embargo, en Hs766T apenas disminuyó el PMM tras 3 y 6 horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. Estos datos, junto con el resultado obtenido con el inhibidor de P38 (**Figura 67**), sugieren que el mecanismo de resistencia de las Hs766T podría estar relacionado tanto con la respuesta a daño en el ADN, como con la respuesta al estrés y los procesos inflamatorios.

NF- κ B es un factor de transcripción que se activa en respuesta a estrés y está implicado en la supervivencia celular y en la respuesta inflamatoria y cuya actividad transcripcional es regulada positivamente por la MAPK P38 [161]. Por lo tanto, existía la posibilidad de que pudiera estar implicado en la resistencia de Hs766T. Para comprobarlo, se midieron los niveles de fosforilación de NF- κ B tras 1 hora de tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala tanto en Hs766T como en IMIM-PC-2 y RWP-1, sensibles a la muerte inducida por el tratamiento. El porcentaje de NF- κ B activado tras finalizar el tiempo de tratamiento en IMIM-PC-2 y RWP-1 fue un $49,8 \pm 11,2\%$ y un $78,9 \pm 4,4\%$ inferior, respectivamente, en comparación con el observado en Hs766T (**Figura 68A**). Con el propósito de determinar si la elevada fosforilación de NF- κ B observada en Hs766T estaba relacionada con su mecanismo de resistencia, se añadió un inhibidor de NF- κ B, BAY 11-7082 (5 μ M), 30 minutos antes de tratar las células con CLytA-DAO y la D-Ala. Al inhibir NF- κ B, en Hs766T se produjo un aumento significativo de los niveles de muerte celular inducidos por CLytA-DAO, mientras que en IMIM-PC-2 y RWP-1 no se produjeron cambios (**Figura 68B**).

Otra vía de transducción activada por p38 y estrechamente relacionada con NF- κ B es la del factor de transcripción Nrf2, codificado por el gen *NFE2L2*. Este factor de transcripción también está estrechamente relacionado con la respuesta al estrés oxidativo, la inflamación y la supervivencia. Por ello, se analizó la expresión de *NFE2L2* en las tres líneas celulares de CP. La expresión de *NFE2L2* en Hs766T fue más del doble que la observada en IMIM-PC-2 y RWP-1 (**Figura 69A**). En este caso, para poder relacionar este gen con la resistencia observada en Hs766T, se utilizó un siRNA con el fin de bloquear su expresión. El siRNA frente a *NFE2L2* bloqueó la expresión del gen en un 95% (**Figura 69B**), causando un aumento en la muerte celular inducida por CLytA-DAO y D-Ala de $2,55 \pm 0,8$ veces con respecto al control transfectado con un siRNA no específico (NS) (**Figura 69C**).

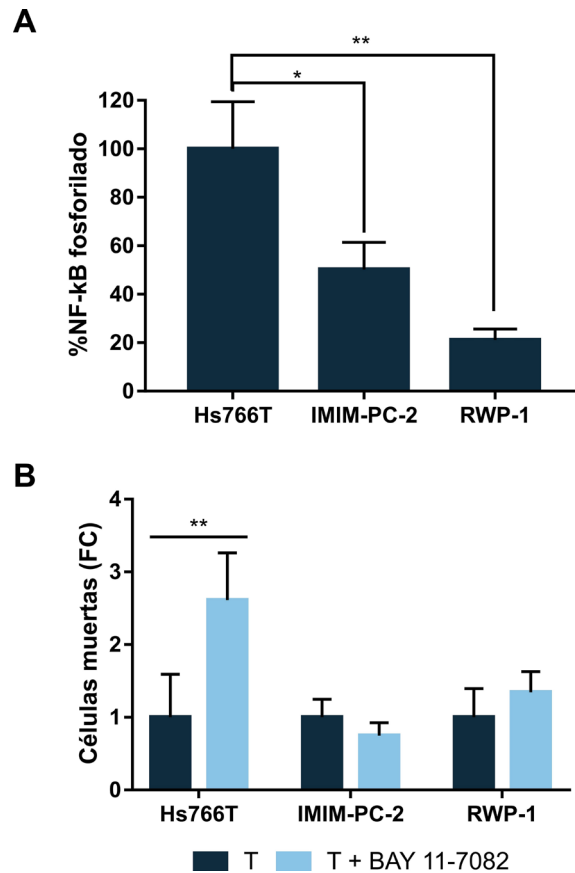


Figura 68. Función de NF-κB en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T. (A) Porcentaje de fosforilación de NF-κB en Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1 tras 1 h de tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala, analizados mediante un ensayo de ELISA. Se representa el porcentaje de NF-κB fosforilado \pm SD con respecto a la línea celular Hs766T ($n \geq 3$). **(B)** Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala tras añadir 5 μ M de BAY-11-7082, un inhibidor de NF-κB. El inhibidor se añadió 30 minutos antes que el tratamiento, y se mantuvo hasta finalizar el mismo, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

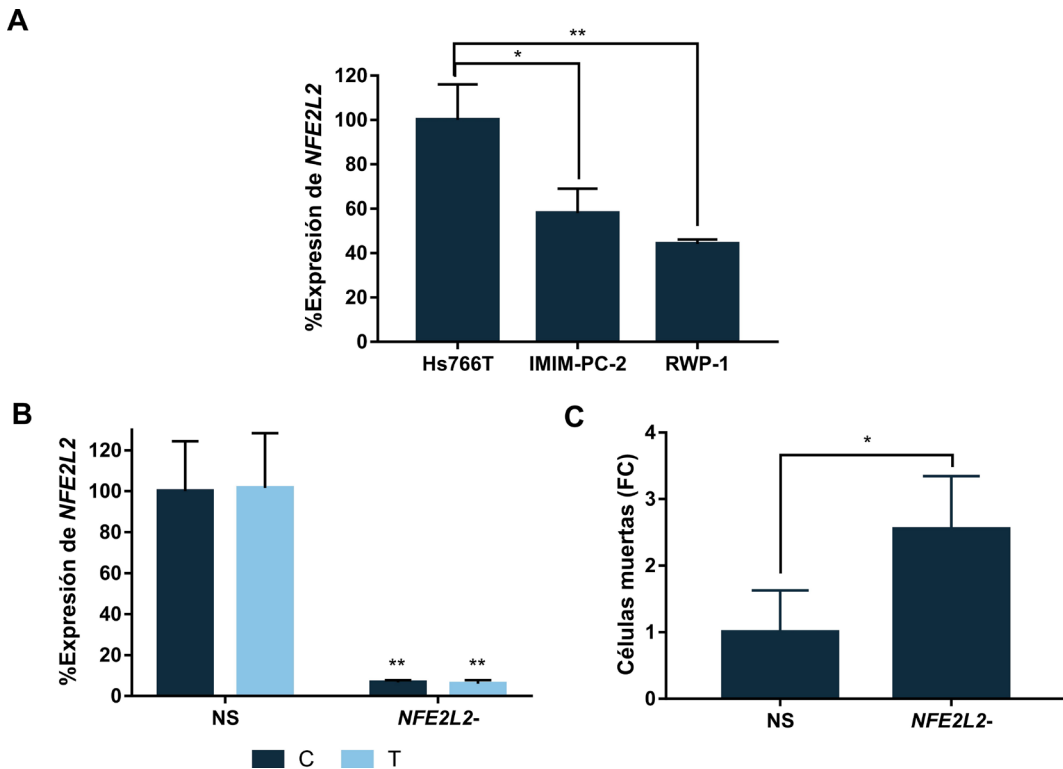


Figura 69. Función de Nrf2 en la resistencia a la muerte inducida por ClytA-DAO en Hs766T. (A) Niveles de expresión de *NFE2L2* en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1. Se representa el porcentaje de expresión de *NFE2L2* \pm SD normalizado con respecto a Hs766T ($n \geq 3$). **(B)** Niveles de expresión de *NFE2L2* en Hs766T, control (C) y tratadas con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala, tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *NFE2L2* (*NFE2L2*-) y otro no específico (NS). Se representa el porcentaje de expresión de *NFE2L2* \pm SD normalizado con respecto al control NS ($n \geq 3$). **(C)** Niveles de células muertas en Hs766T tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *NFE2L2* (*NFE2L2*-) y otro NS y tratadas con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se representa el incremento de células muertas \pm SD tras la transfección con el siRNA frente al *NFE2L2* con respecto al observado con el siRNA NS ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

Está demostrado que Nrf2 regula positivamente a proteínas antioxidantes como la glicosilasa de ADN 8-oxoguanina (OGG1) [162], que participa en la reparación de las lesiones producidas por los radicales libres en el ADN, así como a MRP1 [163], codificada por el gen *ABCC1*. Ambas proteínas están relacionadas con mecanismos de resistencia y tras estudiar los niveles de expresión de *OGG1* y *ABCC1*, de nuevo se obtuvo una mayor expresión en Hs766T que en IMIM-PC-2 y RWP-1 (**Figura 70A, B**). Sin embargo, al bloquear la expresión de *NFE2L2* con un siRNA y medir la expresión de *OGG1* y *ABCC1*, no se

produjeron cambios estadísticamente significativos. De hecho, en lugar de disminuir la expresión de ambos genes, se produjo un aumento (**Figura 70C**).

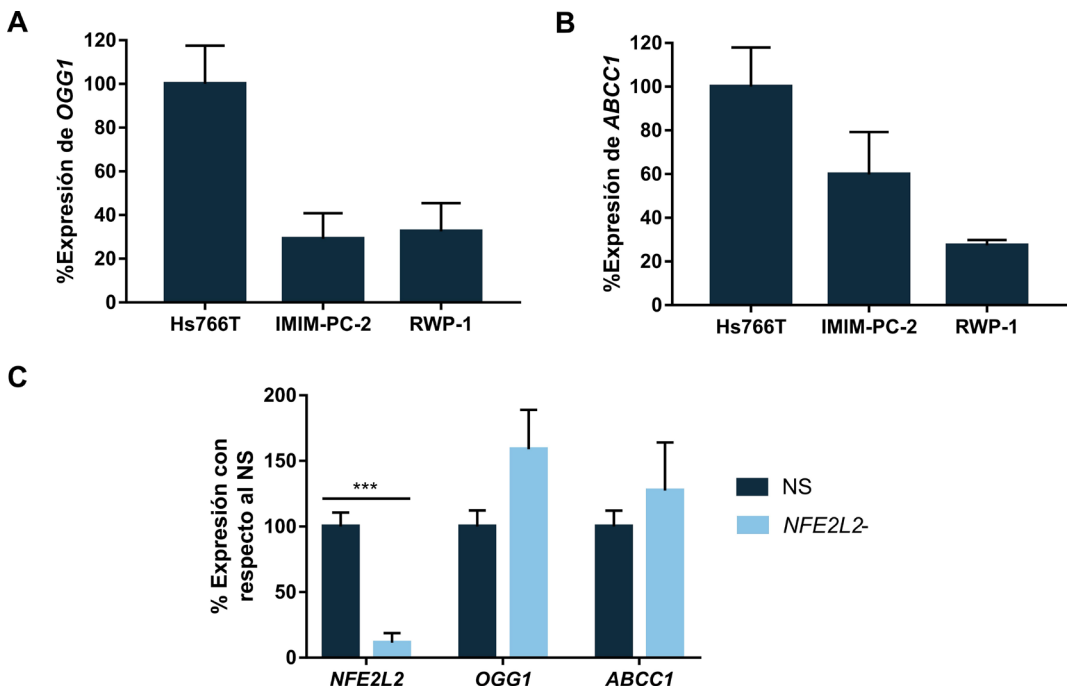


Figura 70. Relación entre Nrf2, OGG1 y MRP1. (A) Niveles de expresión de *OGG1* en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1. Se representa el porcentaje de expresión de *OGG1* \pm SD normalizado con respecto a Hs766T ($n \geq 3$). (B) Niveles de expresión de *ABCC1* en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1. Se representa el porcentaje de expresión de *ABCC1* \pm SD normalizado con respecto a Hs766T ($n \geq 3$). (C) Niveles de expresión de *NFE2L2*, *OGG1* y *ABCC1* en Hs766T tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *NFE2L2* y otro NS. Se representa el porcentaje de expresión \pm SD normalizado con respecto al control NS ($n \geq 3$). *** indica un p-valor $< 0,001$.

Dado que Nrf2 está muy relacionado con la supervivencia, pero también con los mecanismos de detoxificación, seguidamente se estudió la expresión de la catalasa (*CAT*), la principal enzima implicada en la detoxificación de H_2O_2 . Los niveles de expresión de catalasa en Hs766T fueron más de 10 veces superiores a los observados en las líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO, IMIM-PC-2 y RWP-1 (**Figura 71A**). De nuevo, con el objetivo de averiguar si esta sobreexpresión en Hs766T está relacionada con su baja sensibilidad a los efectos causados por el tratamiento con CLytA-DAO, tanto esta línea celular como RWP-1 se transfectaron con un siRNA frente a la catalasa y otro NS y después se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala. El

resultado de la q-PCR demostró no sólo que la transfección bloqueó la expresión de la catalasa en un 95%, sino que además el tratamiento con CLytA-DAO aumentaba la expresión de catalasa 3,4 veces con respecto a la expresión basal en Hs766T y no en RWP-1 (**Figura 71B**). La muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO tras la transfección aumentó $3,0 \pm 0,8$ veces con respecto a la muerte observada con el siRNA NS en Hs766T y no produjo cambios significativos en la muerte celular inducida por CLytA-DAO en RWP-1 (**Figura 71C**).

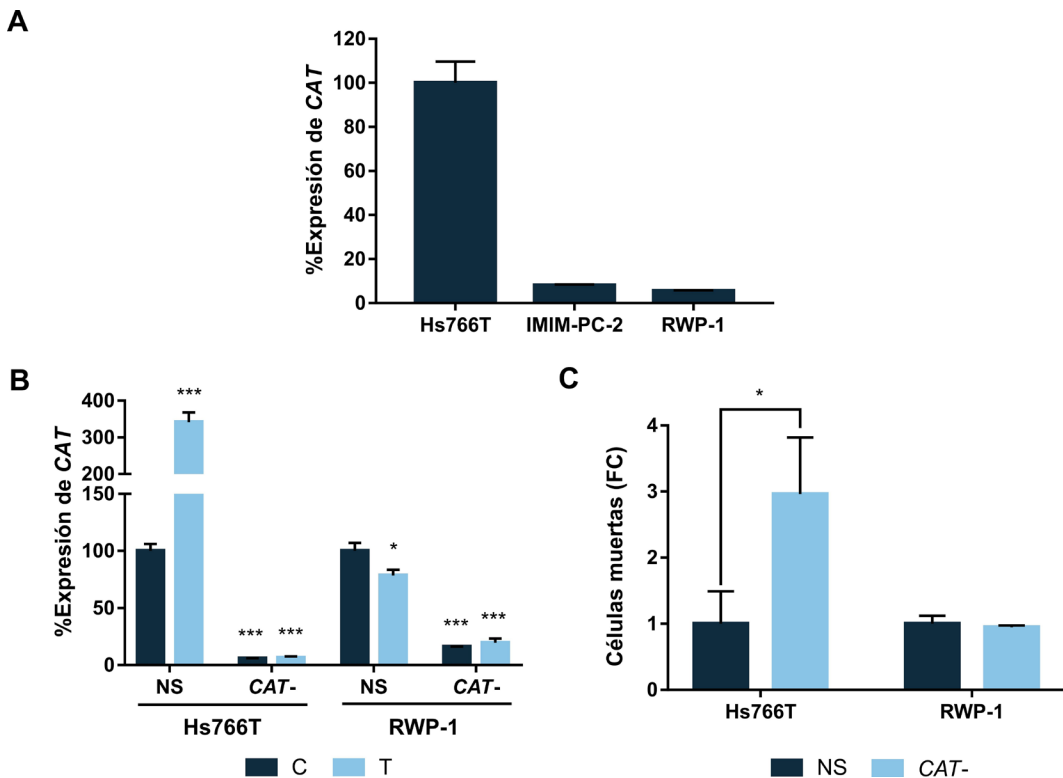


Figura 71. Función de la catalasa en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T. (A) Niveles de expresión de *CAT* en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1. Se representa el porcentaje de expresión de *CAT* \pm SD normalizado con respecto a Hs766T ($n \geq 3$). (B) Niveles de expresión de *CAT* en Hs766T y RWP-1, control (C) y tratadas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala (T), tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *CAT* (CAT-) y otro NS. Se representa el porcentaje de expresión *CAT* \pm SD normalizado con respecto al control NS ($n \geq 3$). (C) Niveles de células muertas en Hs766T y RWP-1 tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a la *CAT* (CAT-) y otro NS y tratadas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se representa el incremento de células muertas \pm SD tras la transfección con el siRNA frente a la *CAT* con respecto al observado con el siRNA NS ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y *** $< 0,001$.

Los resultados recopilados hasta el momento con NF- κ B, Nrf2 y p38 sugerían que la línea celular Hs766T mostraba un estrés basal más elevado que las líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO y que dicho estrés estaba mediando un efecto protector. Esta protección parece tener lugar impidiendo la despolarización de la membrana mitocondrial interna que, como se ha mencionado anteriormente, normalmente está provocada por la entrada de calcio a las mitocondrias. A este respecto, el RE es el principal orgánulo encargado de almacenar el calcio celular y un aumento excesivo de ROS puede causar la salida del calcio del RE y su posterior entrada en la mitocondria. Todos estos datos condujeron a la hipótesis de que la línea celular Hs766T presenta unos elevados niveles de estrés en el RE basales que la protegen del estrés inducido por CLytA-DAO.

Una de las principales proteínas reguladas por la respuesta al estrés en el RE es *XBP-1* (del inglés, *x-box binding proteín-1*). Está demostrado que la sobreexpresión de *XBP-1* protege a las células del estrés oxidativo, reduce la despolarización de la membrana mitocondrial y aumenta la expresión de proteínas antioxidantes [164]. Por ello, se estudiaron los niveles de expresión de *XBP-1*, con y sin *splicing*, en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1, antes y después del tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala. Aunque los niveles de expresión basales no variaron sustancialmente entre las diferentes líneas celulares, tras el tratamiento se observó en Hs766T un aumento significativo de los niveles de *XBP-1*, tanto en su forma completa (**Figura 72A**) como procesada (**Figura 72B**). Este aumento no fue significativo en el resto de las líneas celulares testadas.

Resultados

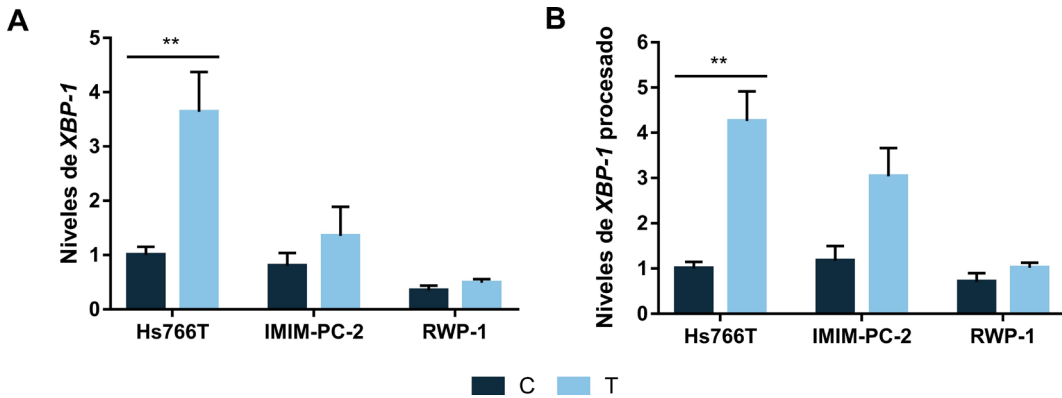


Figura 72. Niveles de expresión de XBP-1, antes y después del splicing. Se midió la expresión de XBP-1 antes (A) y después del *splicing* (B) en las líneas celulares Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1 control (C) y tratadas con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se representa el incremento de los niveles de XBP-1 \pm SD con respecto a Hs766T C ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$.

4.3.3. Evaluación del mecanismo de resistencia al efecto citotóxico inducido por CLytA-DAO en HT-29 de cáncer colorrectal

Los resultados obtenidos en la línea celular HT-29 de CCR indicaban que su resistencia a la muerte celular inducida por el tratamiento estaba relacionada con un menor aumento tanto de los niveles de ROS en el interior celular (Figura 64) como del daño en el ADN (Figura 65). Como sucedió con la línea celular Hs766T, la inhibición de la MAPK P38 indujo un aumento en la cantidad de células muertas a causa del tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, aunque en este caso no fue estadísticamente significativo (Figura 67). Aun así, se analizó la posible participación del factor de transcripción NF- κ B en la resistencia de HT-29. En este caso, además de HT-29, se escogió la línea celular SW-480 de CCR, sensible al tratamiento con CLytA-DAO, y ambas se trataron con el inhibidor BAY 11-7082 (5 μ M) 30 minutos antes de añadir el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala. Sin embargo, únicamente en HT-29 se produjo un incremento significativo de los niveles de muerte celular al inhibir NF- κ B (Figura 73).

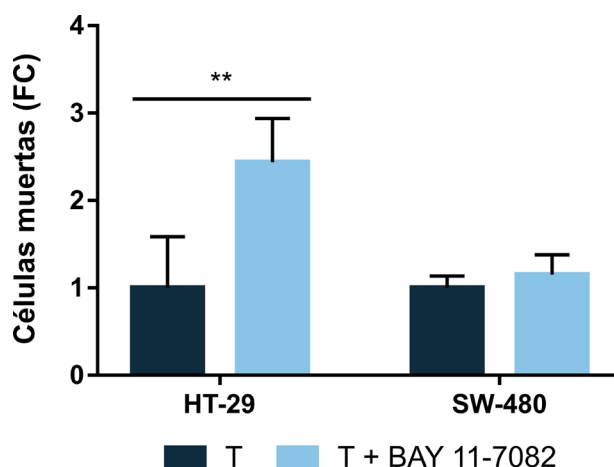


Figura 73. Función de NF- κ B en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en HT-29. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala tras añadir 5 μ M de BAY-11-7082, un inhibidor de NF- κ B. El inhibidor se añadió 30 minutos antes que el tratamiento, y se mantuvo hasta finalizar el mismo, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$.

Dado que NF- κ B parece ser importante en la resistencia tanto en Hs766T como en HT-29, y que en este caso el aumento de las ROS es muy inferior al observado en el resto de las líneas celulares, se analizó la expresión de *NFE2L2*, de *OGG1* y de *CAT* en las líneas celulares de CCR HT-29, SW-480 y SW-620. Los tres genes están relacionados con los mecanismos de detoxificación y parecen estar implicados en el mecanismo de resistencia de Hs766T. Sin embargo, no se observaron grandes diferencias en los niveles de expresión de ninguno de estos genes entre HT-29 y las dos líneas celulares sensibles a CLytA-DAO utilizadas (**Figura 74**). De hecho, la expresión de *NFE2L2*, *OGG1* y *CAT* en HT-29 fue alrededor de un 40%, 55% y 80% inferior a la observada en Hs766T, respectivamente (**Figura 74**). Estos datos sugieren que los mecanismos de resistencia en Hs766T y HT-29 son diferentes, aunque con el nexo de NF- κ B y P38.

Resultados

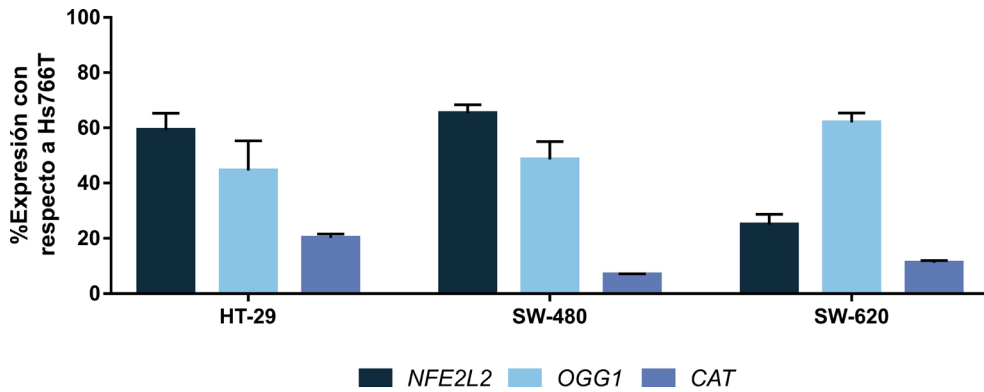


Figura 74. Función de Nrf2, OGG1 y catalasa en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en HT-29. Niveles de expresión de *NFE2L2*, *OGG1* y *CAT* en las líneas celulares HT-29, SW-480 y SW-620 de CCR. Se representa el porcentaje de expresión \pm SD normalizado con respecto al valor observado en Hs766T ($n \geq 3$).

Existen varios estudios en los que se demuestra que HT-29 presenta varias mutaciones asociadas con mal pronóstico, proliferación del tumor y resistencia a fármacos. Algunas de las alteraciones descritas en esta línea celular son la sobreexpresión de la enzima GPX2 [165] y la mutación V600E en el gen *BRAF* [166].

La enzima GPX2 es una proteína gastrointestinal antioxidante capaz de mantener los niveles de peróxido de hidrógeno bajos, y que se ha relacionado con la proliferación tumoral y la capacidad de metástasis [165,167]. Con el fin de evaluar la participación de GPX2 en la resistencia observada en HT-29, se analizaron los niveles de expresión basales en las líneas celulares de CCR. La expresión más alta se observó en la línea celular HT-29, seguida por SW-620, mientras que en SW-480 la expresión de *GPX2* fue aproximadamente un 99,5% inferior a la observada en HT-29 (**Figura 75A**). A continuación, las células HT-29 y SW-620 se transfectaron con un siRNA frente a *GPX2* y otro NS previamente a su tratamiento con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Tras comprobar que la transfección con el siRNA frente a *GPX2* disminuyó su expresión alrededor de un 95% (**Figura 75B**), se analizó la viabilidad celular. Se observó que el bloqueo de la expresión de *GPX2* causó un aumento de la muerte celular inducida por CLytA-DAO de $4,8 \pm 1,4$ veces con respecto a la observada con el siRNA NS en HT-29, mientras que no indujo cambios significativos en la muerte celular inducida por CLytA-DAO en SW-620 (**Figura 75C**).

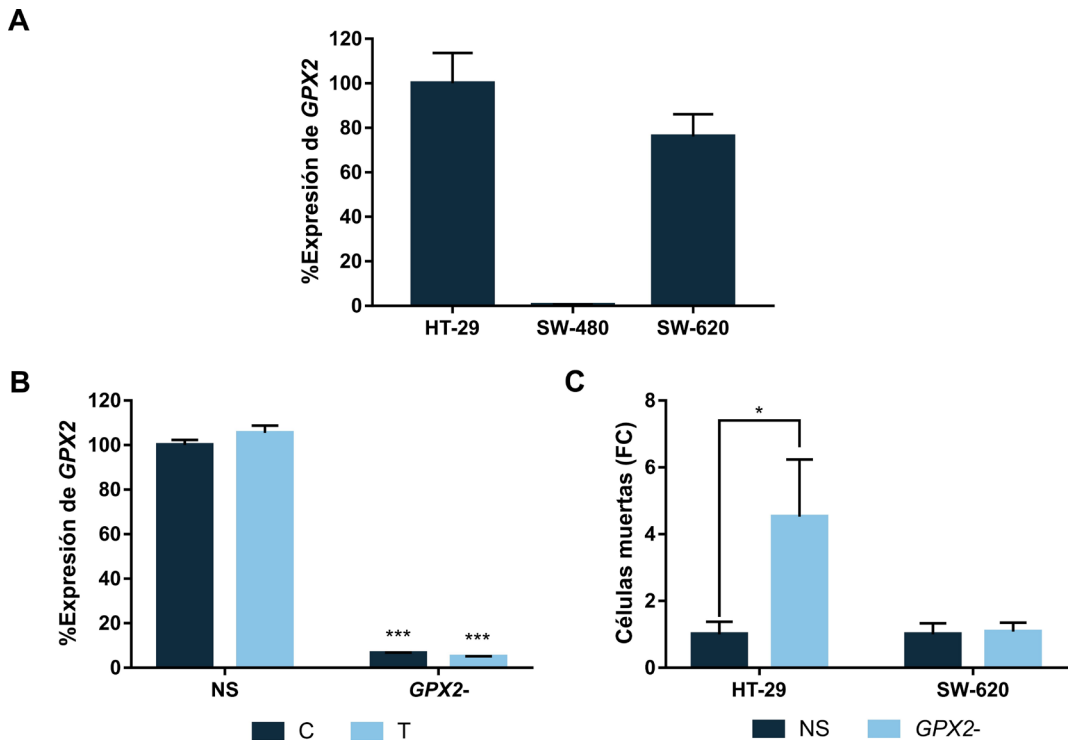


Figura 75. Función de GPX2 en la resistencia a la muerte inducida por ClytA-DAO en HT-29. (A) Niveles de expresión de *GPX2* en las líneas celulares HT-29, SW-480 y SW-620. Se representa el porcentaje de expresión de *GPX2* \pm SD normalizado con respecto a HT-29 ($n \geq 3$). **(B)** Niveles de expresión de *GPX2* en HT-29, control (C) y tratadas con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala (T), tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *GPX2* (*GPX2*-) y otro NS. Se representa el porcentaje de expresión de *GPX2* \pm SD normalizado con respecto al control NS ($n \geq 3$). **(C)** Niveles de células muertas en HT-29 y SW-620 tras haber sido transfectadas con un siRNA frente a *GPX2* (*GPX2*-) y otro NS y tratadas con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 24 horas. Se representa el incremento de células muertas \pm SD tras la transfección con el siRNA frente a la *GPX2* con respecto al observado con el siRNA NS ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y *** $< 0,001$.

Por su parte, BRAF es un componente de la vía de señalización de RAS-RAF, que regula la proliferación celular [138]. La mutación de sustitución V600E está presente en aproximadamente el 10% de pacientes de CCR [168] y está asociada a una baja supervivencia [169]. Esta mutación da lugar a una forma de BRAF constitutivamente activa, que provoca una proliferación celular anormal [170]. El sorafenib es un fármaco utilizado en carcinoma hepatocelular, capaz de inhibir BRAF tanto en su estado *wild-type* como mutado [171] y por ello se utilizó como pretratamiento antes de añadir la enzima ClytA-DAO junto con la D-Ala. La inhibición de BRAF con sorafenib indujo un aumento de la muerte celular inducida por ClytA-DAO y D-Ala tanto en HT-29 como en SW-480,

independientemente del estado mutacional de BRAF (**Figura 76**). Este resultado sugiere que el aumento de la muerte celular inducido por el sorafenib se debe a un efecto no relacionado con la mutación de BRAF.

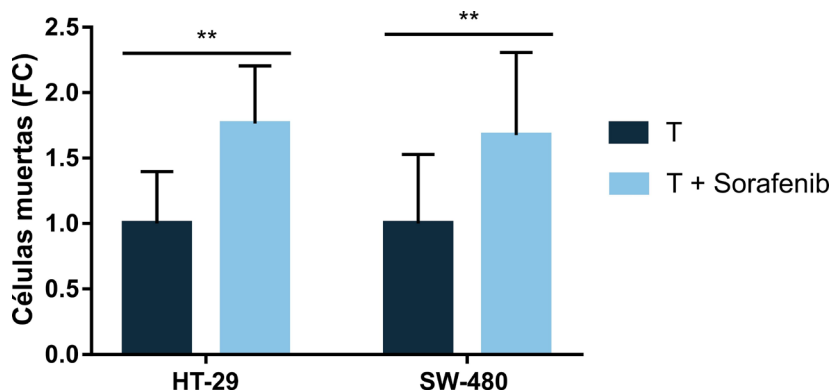


Figura 76. Variación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala al utilizar un pretratamiento con sorafenib. Las líneas celulares HT-29 y SW-480 se trataron con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo o tras un pretratamiento de 30 minutos con 1 μ M de sorafenib. Tras 24 horas de tratamiento, la viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse®. Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala tras haber restado el efecto del sorafenib solo ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$.

4.4. Estudio de la combinación de CLytA-DAO con otros tratamientos antitumorales

4.4.1. Combinación con radioterapia

La radioterapia constituye uno de los principales tratamientos utilizados frente al cáncer. Puede ser utilizada tanto antes como después de la cirugía y en combinación o no con quimioterapia, dependiendo del tipo, la localización y la fase en la que se encuentra el tumor. Este tipo de tratamiento se basa en la aplicación de radiación ionizante sobre la región del tumor con la ayuda de un acelerador lineal. De este modo, la radiación ionizante causa daños directos sobre el ADN y, al entrar en contacto con las moléculas de agua, se ionizan generando radicales libres que también dañarán el ADN de las células [172].

Puesto que tanto el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala como la radioterapia generan radicales libres y daños en el ADN de las células, se decidió combinar dosis bajas de CLytA-DAO junto con radioterapia con el objetivo de potenciar el efecto de ambas.

Inicialmente, se realizó un análisis del ciclo celular 24 horas después de tratar con 7 Gy de radioterapia las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y SW-480 de CCR, observándose un bloqueo estadísticamente significativo del ciclo celular en la fase G₂/M en todas ellas (**Figura 77A**). Resultados previos del laboratorio demuestran que el tratamiento con 7 Gy de radioterapia durante 24 horas causa un bloqueo en la fase G₂/M en todas las líneas celulares derivadas de cultivos primarios de GBM (HGUE-GB-16, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, HGUE-GB-40, HGUE-GB-42 y HGUE-GB-48) [173].

A continuación, se realizó un nuevo análisis del ciclo celular tratando las células con 1 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala, con 7 Gy de radioterapia o bien, combinando ambos tratamientos. La combinación se realizó añadiendo primero la radioterapia y, posteriormente, el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Únicamente en las líneas celulares RWP-1 de CP y HGUE-GB-18 de GBM se produjo una potenciación de la muerte celular al combinar ambos tratamientos. En RWP-1, el tratamiento con CLytA-DAO indujo un aumento del número de células muertas de $6,2 \pm 1,9$ veces con respecto al control, con la radioterapia el aumento fue de $1,7 \pm 1,9$ veces, y al combinar ambas se observó un aumento de $11,0 \pm 1,5$ veces (**Figura 77B**). En el caso de HGUE-GB-18, el aumento de células muertas fue de $1,4 \pm 1,2$ veces con CLytA-DAO, de $1,7 \pm 0,3$ veces con la radioterapia y de $7,0 \pm 1,6$ veces con respecto al control al combinar ambos tratamientos. En cambio, el efecto observado en IMIM-PC-2 al combinar ambos tratamientos fue aditivo y, en SW-480 el resultado fue muy similar al observado sólo con el tratamiento de CLytA-DAO y D-Ala (**Figura 77B**).

Resultados

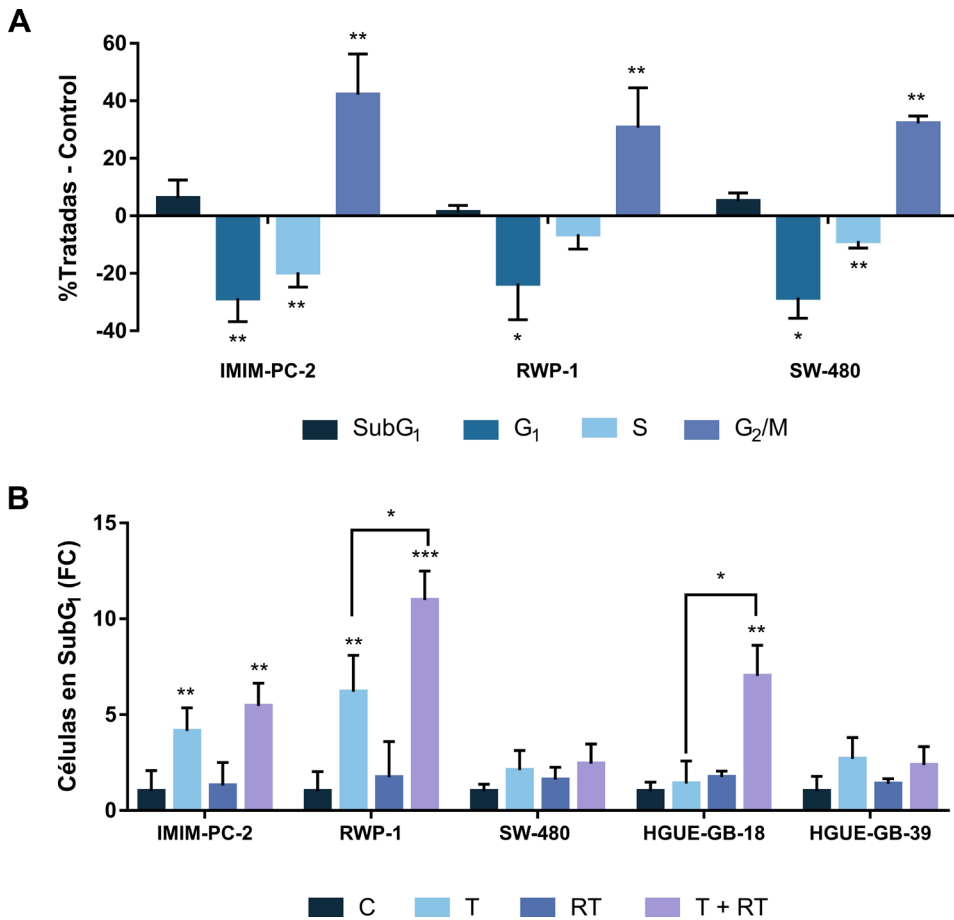


Figura 77. Efecto de la combinación del tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala junto con radioterapia. (A) Las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1 y SW-480 se trataron con radioterapia a 7 Gy y se mantuvieron en incubación durante 24 horas. El análisis del ciclo celular se realizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD tras haberles restado el porcentaje en el control ($n \geq 3$). **(B)** Se analizó el ciclo celular de las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, HGUE-GB-18 y HGUE-GB-39, control (C), tratadas con 1 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala (T), con 7 Gy de radioterapia (RT) o con la combinación de ambos tratamientos (T + RT) con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el incremento de los niveles de células en fase SubG₁ \pm SD con respecto al control ($n \geq 3$). ** indica un p-valor $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

4.4.2. Combinación con quimioterapia

El BCNU es un fármaco quimioterapéutico utilizado principalmente frente a tumores cerebrales. Se trata de un agente alquilante capaz de producir entrecruzamientos entre las cadenas del ADN, evitando la replicación y transcripción [174].

Inicialmente, se analizó el efecto del BCNU (50 μ M) sobre el ciclo celular de dos líneas celulares de GBM, T98 y HGUE-GB-37. En la línea celular T98 el efecto del BCNU fue principalmente citostático, causando un bloqueo en la fase G₂/M del ciclo celular, mientras que en HGUE-GB-37 se observó un efecto citostático y citotóxico, ya que además del bloqueo en la fase G₂/M, el porcentaje de células muertas aumentó en un $27,6 \pm 13,6\%$ con respecto al control (**Figura 78A**).

A continuación, para determinar si el tratamiento con 1 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala potenciaba el efecto del BCNU, las células se trataron con ambos fármacos por separado y combinados durante 24 horas. Al combinar el tratamiento de CLytA-DAO con BCNU, en T98 se produjo una potenciación de la muerte celular, mientras que en HGUE-GB-37 el efecto fue muy similar al observado con los tratamientos por separado (**Figura 78B**).

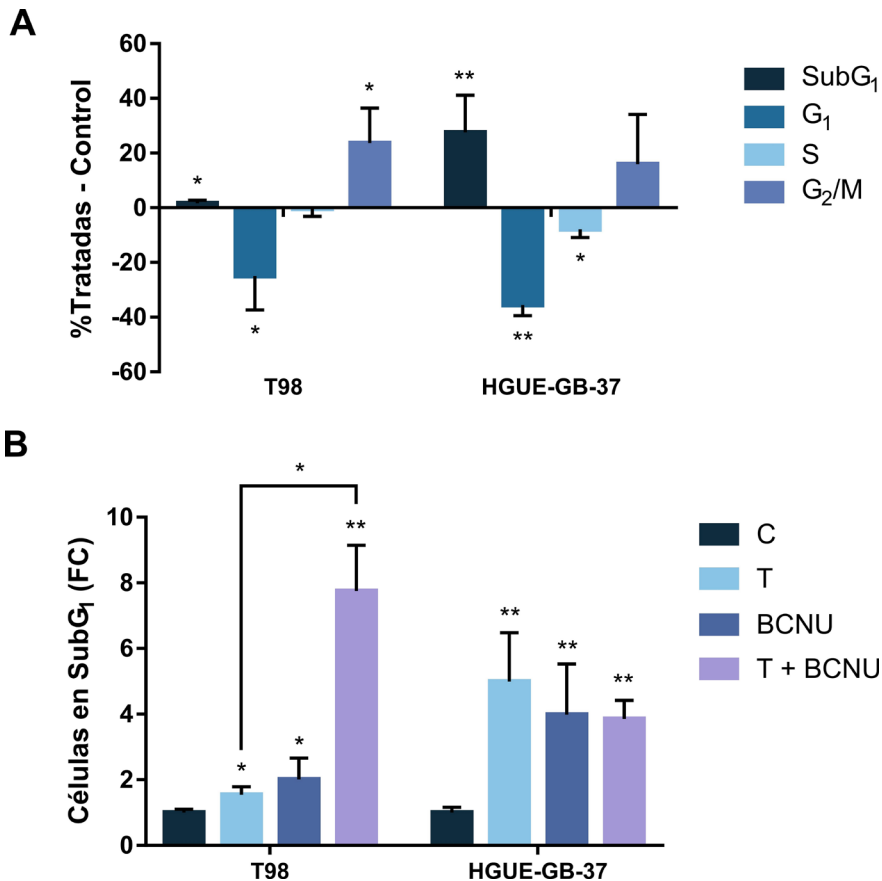


Figura 78. Efecto de la combinación del tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala junto con BCNU. (A) Las líneas celulares T98 y HGUE-GB-37 se trataron con 50 μ M de BCNU durante 24 horas. El análisis del ciclo celular se realizó con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular \pm SD tras haberles restado el porcentaje en el control ($n \geq 3$). **(B)** Se analizó el ciclo celular de las líneas celulares T98 y HGUE-GB-37, control (C), tratadas con 1 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala (T), con 50 μ M de BCNU (BCNU) o con la combinación de ambos tratamientos (T+ BCNU) con el citómetro de flujo FACS CANTO II. Se representa el incremento de los niveles de células en fase SubG₁ \pm SD con respecto al control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$ y ** $< 0,01$.

4.4.3. Combinación con otros tratamientos antitumorales

Finalmente, se decidió combinar el tratamiento con ClytA-DAO con otros fármacos utilizados en clínica como alternativas terapéuticas en pacientes resistentes a la quimio y/o radioterapia o como potenciadores de los tratamientos convencionales.

En primer lugar, se probó la combinación con TSA, un inhibidor de desacetilasas de histonas (HDAC) [175]. Las HDAC eliminan los grupos acetilo de las lisinas de las histonas generando una mayor compactación de la cromatina, que conlleva el silenciamiento de diferentes genes. Se trata de un mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica en el que participan tanto las HDAC como las acetiltransferasas de histonas. Los inhibidores de HDAC revierten la acción de estas proteínas, resultando en la hiperacetilación de las histonas y provocando una sobreexpresión de determinados genes. Está demostrado que los inhibidores de HDAC tienen un efecto antiproliferativo sobre las células tumorales induciendo el bloqueo del ciclo celular y/o la muerte celular [176,177].

Para estudiar el efecto combinatorio, se realizaron estudios de viabilidad en las líneas celulares IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP y HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de GBM tratadas con 1 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala, con 100 nM de TSA o combinando ambos tratamientos. La combinación de ambos tratamientos resultó en un efecto aditivo en IMIM-PC-2, RWP-1 y HGUE-GB-39, mientras que en HGUE-GB-18 y HGUE-GB-37 se produjo una potenciación del efecto estadísticamente significativa (**Figura 79**).

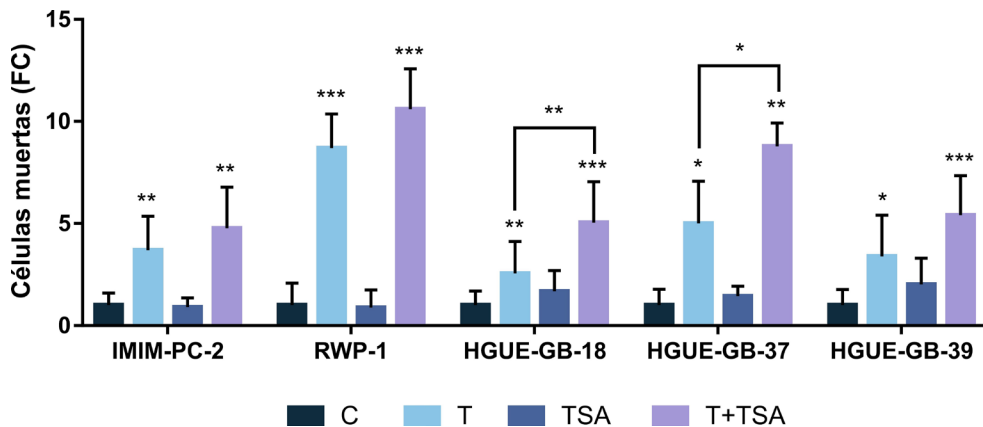


Figura 79. Efecto de la combinación del tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala junto con TSA. Se analizó la viabilidad celular de las líneas celulares IMIM-PC-2, RWP-1, HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39, control (C), tratadas con 1 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala (T), con 100 nM de TSA (TSA) o con la combinación de ambos tratamientos (T+TSA). Se representa el incremento de los niveles de células muertas \pm SD con respecto al control ($n \geq 3$). * indica un p-valor $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$.

Otros compuestos utilizados como tratamiento anticancerígeno son los inhibidores de PARP. Existen fármacos inhibidores de PARP que han sido aprobados como tratamiento *per se*, y otros que se utilizan en combinación con quimio y/o radioterapia para potenciar los efectos [178]. En el **apartado 4.2.5.** se ha evaluado el papel de PARP por su participación en la muerte celular "*parthanatos*". Sin embargo, PARP tiene una doble función: si los daños en el ADN son muy elevados activa un mecanismo de muerte celular, pero si el daño es leve, se une a la región en la que se ha producido el daño y recluta a las enzimas encargadas de la reparación del ADN [135]. Por ello, los inhibidores de PARP pueden aumentar la supervivencia en pacientes con tipos de cáncer muy dependientes de su actividad, pero también pueden potenciar otros tratamientos que actúan dañando el ADN de las células tumorales.

En la **Figura 60** se puede observar el efecto de combinar la inhibición de PARP con el tratamiento con CLyTA-DAO en líneas celulares de CP y CCR, puesto que se estaba evaluando el mecanismo de muerte celular generado. Sin embargo, en este apartado, dicha combinación se va a utilizar con el objetivo de potenciar el efecto de CLyTA-DAO en las líneas celulares de GBM. Para comprobar si se producía la potenciación, se analizó la viabilidad celular en las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 tratadas con 2 U/mL de CLyTA-DAO y 1 mM de D-Ala con o sin añadir 10 μ M de DPQ, el inhibidor de PARP. En las tres líneas celulares utilizadas, la combinación de ambos tratamientos potenció la muerte celular (**Figura 80**).

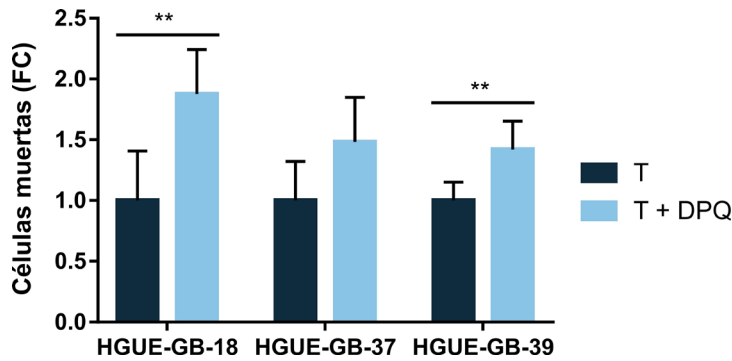


Figura 80. Efecto de la combinación del tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala junto con DPQ. Las líneas celulares HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 se trataron con 2 U/mL de ClytA-DAO y 1 mM de D-Ala solo (T) o tras un pretratamiento con 10 μ M de DPQ (T + DPQ), un inhibidor de PARP-1. El inhibidor se añadió 30 minutos antes que el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala y se mantuvo hasta finalizado el tratamiento, tras 24 horas. La viabilidad celular se estudió con el analizador celular Muse[®]. Se representa el incremento de la muerte celular \pm SD con respecto a los niveles observados con el tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala ($n \geq 3$). ** indica un p-valor < 0,01.

4.5. Evaluación de los genes implicados en la resistencia a ClytA-DAO en biopsias de pacientes

En el **apartado 4.3.** se determinó que la sensibilidad o resistencia a la muerte celular inducida por ClytA-DAO es mediada por la expresión de genes involucrados principalmente en la respuesta al estrés oxidativo y la supervivencia celular. Identificados estos genes, se inició un estudio piloto en muestras de pacientes con la intención de estimar el impacto que su expresión podría tener en la efectividad de un tratamiento con ClytA-DAO y D-Ala. Para ello, se extrajo ARN de biopsias obtenidas de un reducido grupo de pacientes con CP, CCR y GBM (10 pacientes por cada tipo de tumor), se determinó la expresión de los genes y se comparó con la obtenida en las líneas celulares, normalizando los datos con respecto a la expresión obtenida en los modelos celulares resistentes. Al disponer de un número de biopsias muy reducido, también se realizó un estudio comparativo de la expresión de estos genes con la herramienta UALCAN, un portal web que permite realizar análisis de expresión génica y de supervivencia en diferentes tipos de tumores con datos extraídos del proyecto “*The Cancer Genome Atlas*” (TCGA) [179].

Los datos obtenidos en el **apartado 4.3.2.** sugieren que la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO en Hs766T es debida principalmente a un estrés basal elevado en el RE, que implica la elevada expresión de varios genes relacionados con la resistencia al estrés oxidativo. Con el programa UALCAN es posible estudiar los niveles de expresión de los genes que codifican las proteínas relacionadas con el estrés en los diferentes tipos de tumores y ver cómo dicha expresión afecta al pronóstico del paciente.

Las principales proteínas que se evaluaron por su posible relación con el mecanismo de resistencia frente a CLytA-DAO en Hs766T fueron NF-kB, que también demostró participar en la resistencia de la línea celular HT-29 de CCR, Nrf2, OGG1, MRP1 y catalasa. Al comparar la expresión del gen *NFKB1* entre los tres tipos de tumores con los datos almacenados en UALCAN, se observó una menor expresión en los pacientes de GBM con respecto a la observada en CP, CC y CR (**Figura 81**). Los tejidos de CC presentan además una expresión más baja que el tejido sano (p-valor: 0,0033) (**Figura 81**).

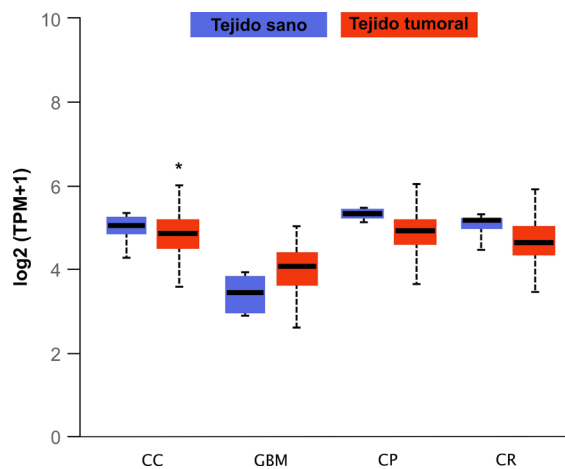


Figura 81. Expresión de *NFKB1* en las muestras extraídas de TGCA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de *NFKB1* en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). * indica un p-valor < 0,05.

A continuación, se comparó la expresión del gen *NFE2L2* observada en las líneas celulares y en las biopsias procedentes de pacientes con CP, CCR y GBM. En general, la expresión de *NFE2L2* en las líneas celulares de CP, CCR y GBM osciló entre el 29-73,7% con respecto a la observada en Hs766T, con la excepción de la línea celular T98, cuya expresión fue un 320% con respecto a Hs766T (**Figura 82**). Las biopsias obtenidas de los pacientes de CP mantuvieron una expresión inferior al 15% con respecto a la observada en Hs766T. Algo similar ocurrió en los pacientes de CCR, con la excepción de un paciente cuya expresión de *NFE2L2* fue de un $61,4 \pm 13,2\%$ con respecto a la de Hs766T (**Figura 82**). Sin embargo, en las muestras de GBM se produjo una mayor variabilidad, seis de los pacientes mostraron una expresión inferior al 15%, tres de ellos tuvieron $36,4 \pm 14,7\%$, $89,0 \pm 16,3\%$ y $183,7 \pm 19,4\%$ y, hubo uno cuya expresión fue de $1246,7 \pm 171,5\%$ con respecto a la observada en Hs766T (**Figura 82**).

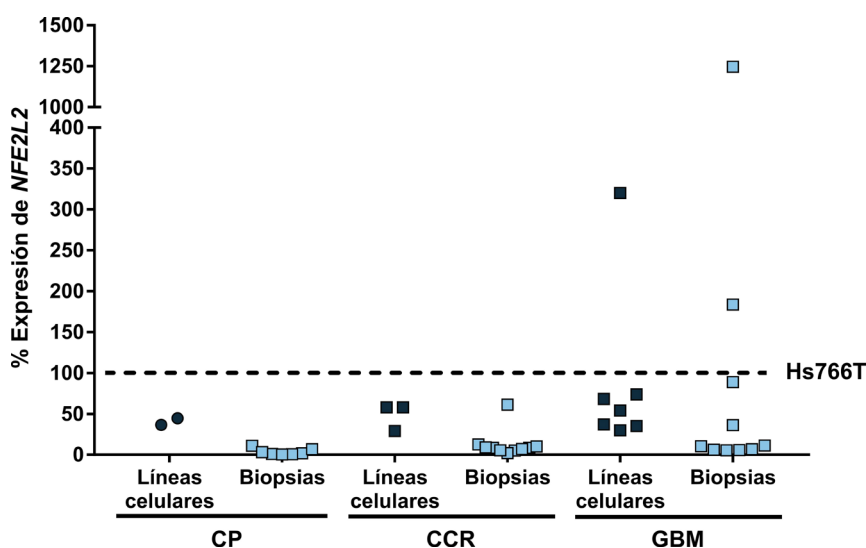


Figura 82. Expresión del gen *NFE2L2* en líneas celulares y biopsias de pacientes. Se representa el porcentaje de expresión de *NFE2L2* en las líneas celulares y biopsias de pacientes con carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma normalizados con respecto a los observados en Hs766T.

Aunque no se observaron diferencias de expresión entre los pacientes de CP, CC, CR y GBM en los datos extraídos de UALCAN, sí que se detectó que, al comparar la expresión entre el tejido tumoral y el sano, los pacientes de CC tienen una menor expresión de *NFE2L2* (p-valor: 0,038), mientras que los pacientes de GBM tienen una

mayor expresión con respecto al cerebro sano (p-valor: 0,014) (**Figura 83**). Los análisis de supervivencia indicaron además que una elevada expresión de *NFE2L2* en pacientes con CP es indicador de mal pronóstico (p-valor: 0,023), mientras que en CCR y GBM no se observan cambios significativos en cuanto a supervivencia.

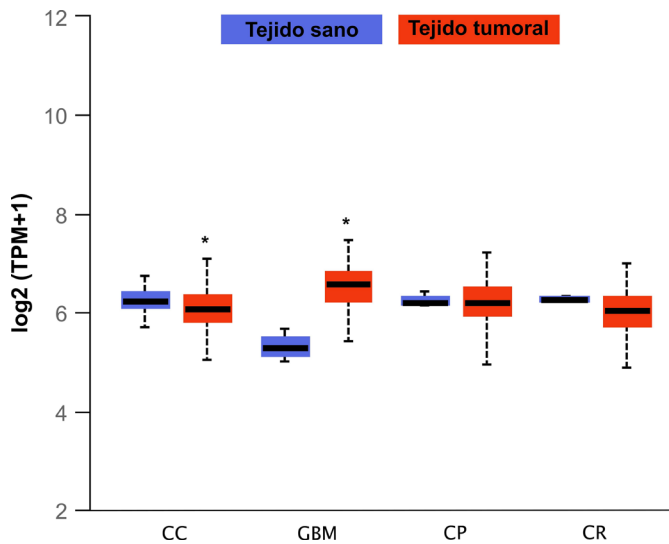


Figura 83. Expresión de *NFE2L2* en las muestras extraídas de TGCA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de *NFE2L2* en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). * indica un p-valor < 0,05.

Otro de los genes altamente expresado en Hs766T con respecto a las líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO fue *OGG1*, que codifica una glicosilasa de ADN involucrada en la reparación por escisión de bases. Tras estudiar los niveles de expresión de *OGG1* en todas las líneas celulares de CP, CCR y GBM, los resultados indicaron que la sobreexpresión de este gen no es crucial para la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO, puesto que, aunque la línea celular Hs766T, resistente a la muerte inducida por CLytA-DAO, presenta una elevada expresión del gen, otras líneas celulares que sí son sensibles a la muerte inducida por el tratamiento, mostraron niveles de expresión similares (**Figura 84**). En general, las diferencias en los niveles de expresión entre todas las líneas celulares estudiadas no fueron tan pronunciadas como ocurrió en

otros genes, siendo el valor más bajo el observado en IMIM-PC-2 con una expresión del $47,44 \pm 8,8\%$ con respecto a Hs766T (**Figura 84**).

El análisis se complementó con un estudio en las biopsias de pacientes y, cabe destacar que en todas las muestras se observaron unos niveles de expresión inferiores al 3% con respecto a Hs766T. Esto parece indicar que la expresión de este gen aumenta en el proceso de establecimiento de líneas celulares.

Los análisis realizados con UALCAN indicaron que las muestras de CC, CR y GBM presentan una expresión de *OGG1* más elevada en comparación con los tejidos sanos correspondientes (**Figura 85**). En este caso sí que se observan diferencias en cuanto a la expresión entre los diferentes tipos de tumores, de forma que los pacientes de GBM contienen la expresión de *OGG1* más alta, seguidos de los pacientes con CC y CR y, por último, los pacientes de CP (**Figura 85**), un patrón similar al observado con los análisis de expresión realizados en las líneas celulares (**Figura 84**).

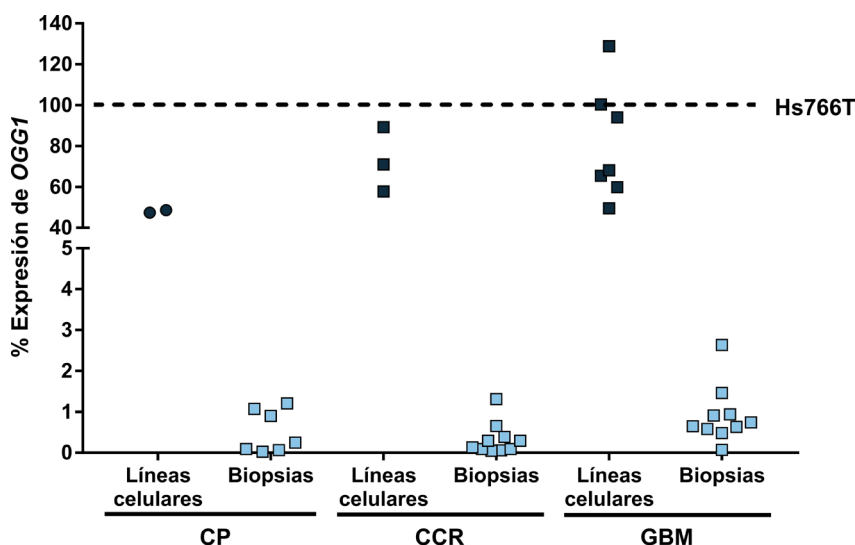


Figura 84. Expresión del gen *OGG1* en líneas celulares y biopsias de pacientes. Se representa el porcentaje de expresión de *OGG1* en las líneas celulares y biopsias de pacientes de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma normalizados con respecto a los observados en Hs766T.

Resultados

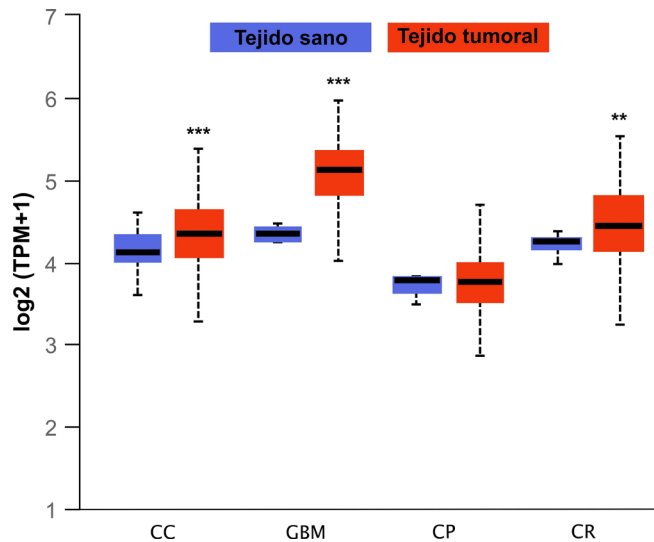


Figura 85. Expresión de *OGG1* en las muestras extraídas de TGCA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de *OGG1* en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). ** indica un p-valor < 0,01 y *** < 0,001.

El gen *ABCC1*, que codifica la proteína MRP1, también demostró estar altamente expresado en Hs766T. De hecho, al comparar todas las líneas celulares, la mayor expresión tuvo lugar en esta línea celular, seguida por IMIM-PC-2, cuya expresión fue aproximadamente la mitad ($52,7 \pm 11,1\%$). El resto de las líneas celulares mostraron una expresión más de un 80% inferior a la observada en Hs766T, siendo HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 y HGUE-GB-40 las líneas celulares con menor expresión de *ABCC1* (**Figura 86**). En las biopsias de pacientes, se obtuvo un resultado muy similar al observado en *OGG1*. Es decir, la expresión fue inferior al 0,6% con respecto a Hs766T en todas las muestras ensayadas (**Figura 86**), lo que sugiere que la transformación en líneas celulares implica un aumento en la expresión de este gen y, por lo tanto, una mayor resistencia a fármacos.

Resultados

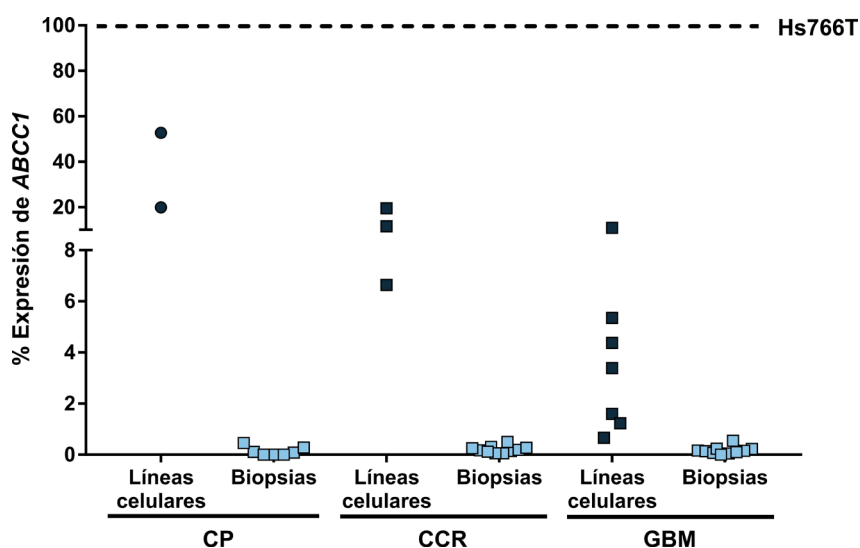


Figura 86. Expresión del gen *ABCC1* en líneas celulares y biopsias de pacientes. Se representa el porcentaje de expresión de *ABCC1* en las líneas celulares y biopsias de pacientes de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma normalizados con respecto a los observados en Hs766T.

Tras analizar los datos de los pacientes almacenados en UALCAN, se observó que generalmente la expresión de *ABCC1* en GBM es más baja con respecto a la observada en CP, CC y CR (**Figura 87**). Además, en los pacientes de CC y CR la expresión es más elevada en el tejido tumoral que en el sano (p -valor < 0,001) (**Figura 87**).

El último de los genes cuya sobreexpresión ha demostrado estar relacionada con la resistencia de Hs766T es *CAT*. Al analizar la expresión de *CAT* en todas las líneas celulares de los tres tipos de tumor, la expresión más elevada se produjo en Hs766T, mientras que en el resto de las líneas celulares fue más de un 80% inferior (**Figura 88**). Con respecto a las biopsias de pacientes, la expresión de *CAT* estuvo en el rango de 0,2%-10,1% y, la expresión más baja estuvo en un paciente de CP, mientras que la más elevada se produjo en GBM (**Figura 88**).

Resultados

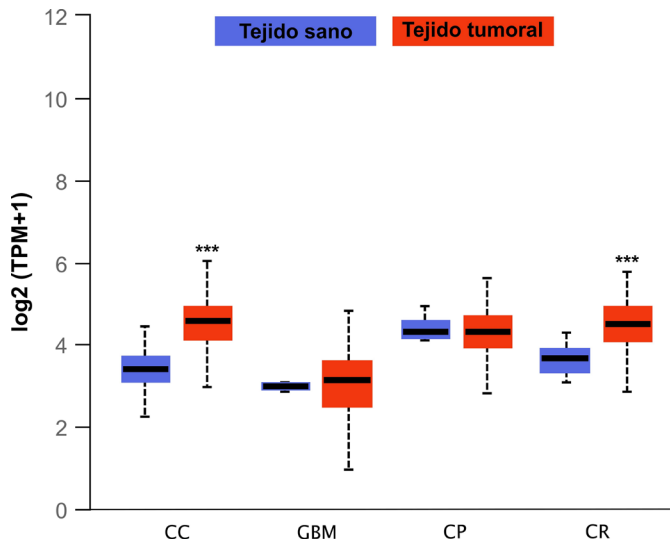


Figura 87. Expresión de *ABCC1* en las muestras extraídas de TGCA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de *ABCC1* en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). *** indica un p-valor < 0,001.

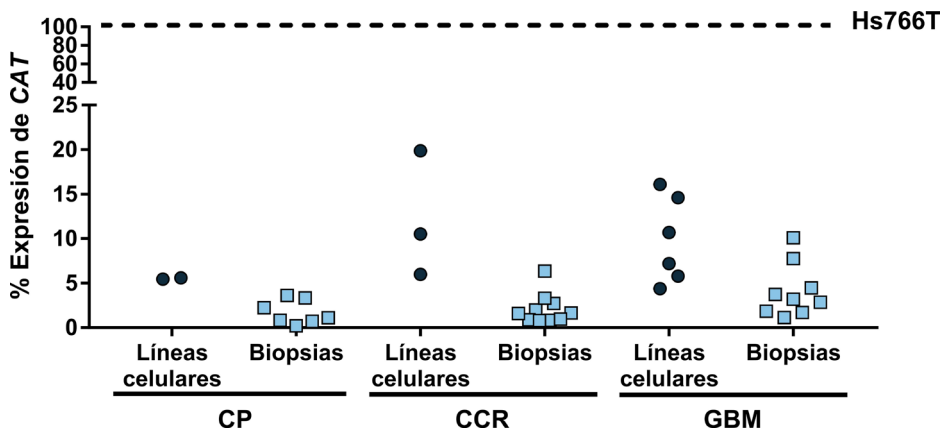


Figura 88. Expresión del gen *CAT* en líneas celulares y biopsias de pacientes. Se representa el porcentaje de expresión de *CAT* en las líneas celulares y biopsias de pacientes de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma normalizados con respecto a los observados en Hs766T.

Con los datos almacenados en UALCAN observamos que la expresión de *CAT* en tejidos obtenidos de pacientes con CP, CC, CR y GBM es similar (**Figura 89**). Únicamente, en las muestras de colon y recto se observa una expresión de *CAT* significativamente inferior en los pacientes de adenocarcinoma de colon con respecto al tejido normal (**Figura 89**), aunque esto no parece afectar a la supervivencia.

Resultados

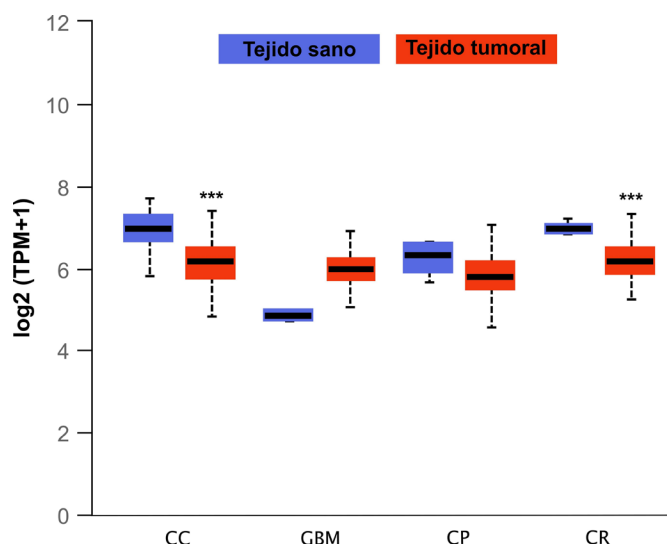


Figura 89. Expresión de CAT en las muestras extraídas de TCGA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de CAT en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). *** indica un p-valor < 0,001.

HT-29 de CCR también demostró ser resistente a la muerte celular inducida por CLytA-DAO, aunque por mecanismos diferentes a los observados en Hs766T. En este caso, parece que parte de la resistencia viene mediada por la detoxificación inducida por la enzima antioxidante GPX2. Con respecto a las líneas celulares de CP, la expresión de GPX2 estuvo entre el 0,004-0,127% con respecto a HT-29 (**Figura 90**). Como se describe en el **apartado 4.3.3.**, la expresión de SW-480 y SW-620 fue de $0,44 \pm 0,04\%$ y de $81,2 \pm 6,4\%$ con respecto a HT-29, respectivamente (**Figura 90**). Sin embargo, en las líneas celulares de GBM sólo encontramos una expresión mínima de GPX2 en T98 (**Figura 90**). Con respecto a las biopsias de pacientes, seis de las muestras de CP y seis de las de CCR mostraron niveles de expresión similares a los observados en las líneas celulares de CP y en SW-480 de CCR (**Figura 90**). La expresión más elevada se observó en una de las muestras de CP, que obtuvo $6,32 \pm 0,46\%$ con respecto a HT-29 y, las cuatro muestras de CCR restantes estuvieron entre 0,8-2,03% (**Figura 90**). En cambio, no se observó expresión de GPX2 en ninguna de las muestras de GBM (**Figura 90**).

Al analizar la expresión de GPX2 con los datos de los pacientes almacenados en UALCAN se observó que la mayor expresión se produce en CC y CR, seguido de CP y, finalmente de GBM (**Figura 91**). Además, la expresión en pacientes con CC y CR es superior

a la observada en el tejido sano (**Figura 91**) y, los análisis de Kaplan Meier demuestran que una alta expresión de *GPX2* en GBM implica una baja supervivencia del paciente (p-valor: 0,003).

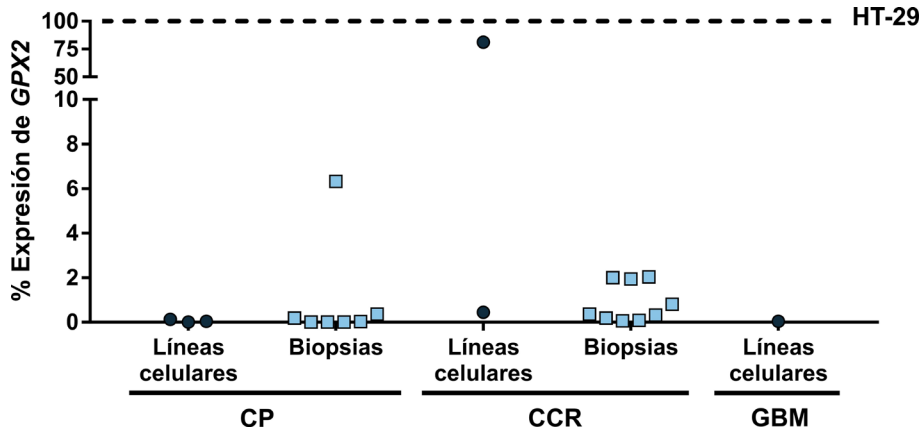


Figura 90. Expresión del gen *GPX2* en líneas celulares y biopsias de pacientes. Se representa el porcentaje de expresión de *GPX2* en las líneas celulares y biopsias de pacientes de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma normalizados con respecto a los observados en HT-29.

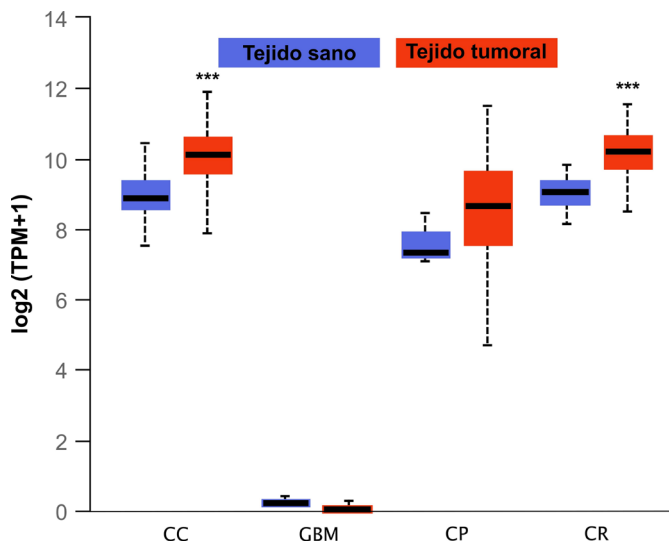


Figura 91. Expresión de *GPX2* en las muestras extraídas de TGCA. Datos extraídos de UALCAN que representan la expresión de *GPX2* en transcritos por millón (TPM) en muestras de tejido sano (azul) y tumoral (rojo) de pacientes con carcinoma de colon (CC), glioblastoma (GBM), carcinoma de páncreas (CP) y carcinoma de recto (CR). *** indica un p-valor < 0,001.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

**Me he subido a mi mesa para recordarme que
siempre hay que mirar las cosas de un modo
diferente.**

EE CLUB DE LOS POETAS MUERTOS.

Uno de los principales problemas del tratamiento del cáncer es la toxicidad generada por los fármacos quimioterapéuticos y por la radiación sobre las células no tumorales. Por ello, surge la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos que focalicen el daño sobre las células tumorales, evitando la aparición de efectos secundarios.

El presente trabajo se centra en la evaluación del potencial de la enzima DAO de *Rhodotorula gracilis* como posible tratamiento anticancerígeno. Esta enzima genera estrés oxidativo al entrar en contacto con su sustrato, los D-aminoácidos [110]. A diferencia de otras enzimas generadoras de estrés oxidativo, como la xantina oxidasa o la glucosa oxidasa, en condiciones normales, el sustrato de la DAO se encuentra en cantidades mínimas en el organismo [180]. De este modo, se podría regular la producción de H₂O₂ mediante el control de las dosis de D-aminoácidos. Por otro lado, con el objetivo de poder dirigir la enzima hacia la región del tumor, se ha utilizado una enzima quimérica que presenta unido el dominio CLyTA, que le confiere alta afinidad por la colina y análogos [181]. De este modo, es posible inmovilizarla en cualquier tipo de nanopartícula que contenga colina o DEAE en su superficie de forma sencilla y rápida.

El estudio del sistema CLyTA-DAO/D-Ala se ha realizado en modelos celulares de CP, CCR y GBM. El CP y el GBM son dos tipos de tumores muy agresivos y con muy mal pronóstico y ambos carecen de un tratamiento eficaz. El CCR, aunque tiene mejor pronóstico que los dos anteriores, es muy frecuente en la población y, tras el tratamiento, en muchos de los pacientes se produce una recurrencia del tumor. Además, todos ellos muestran un elevado número de casos que desarrollan resistencias frente a los tratamientos comúnmente utilizados en clínica.

5.1. CLyTA-DAO junto con D-Ala induce un efecto citotóxico sobre la mayoría de los modelos tumorales evaluados

El estudio se inició evaluando la capacidad antiproliferativa del tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala en tres líneas celulares de CP, cuatro de CCR y ocho de GBM, de las cuales seis habían sido establecidas como cultivos primarios por nuestro grupo de investigación a partir de aspirados cerebrales [155].

Para determinar el efecto antiproliferativo, se realizaron ensayos de MTT utilizando concentraciones crecientes de la enzima quimérica CLyTA-DAO en combinación con 1 mM de D-Ala y, con las curvas obtenidas al representar el porcentaje de inhibición de la proliferación celular, se calculó el valor de IC₅₀. En todas las líneas celulares testadas se produjo una disminución de la proliferación celular dependiente de la concentración, obteniéndose valores muy similares con la dosis más alta utilizada, 2 U/mL (**Figura 31**). No obstante, al observar los valores de IC₅₀ y el porcentaje de inhibición de la proliferación celular a dosis bajas, se pudieron diferenciar tres grupos en función de la sensibilidad. El primer grupo está formado por las líneas celulares más sensibles a CLyTA-DAO, con un IC₅₀ inferior a 0,3 U/mL, que son las tres líneas celulares de CP (Hs766T, IMIM-PC-2 y RWP-1), SW-480, SW-620 y HGUE-C-1 de CCR y, U87 y HGUE-GB-39 de GBM. El segundo grupo lo forman el resto de las líneas celulares de GBM, que generalmente son menos sensibles que las de CP y CCP, y su IC₅₀ está en el rango de 0,3-0,6 U/mL. Finalmente, se encuentra la línea celular HT-29 de CCR, cuyo IC₅₀ de 0,66 U/mL la convierte en la línea celular más resistente (**Tabla 9**). Por otra parte, mediante ensayos de MTT se confirmó que la dosis óptima D-Ala es 1 mM (**Figura 32, Tabla 10**), aunque este dato ya había sido establecido previamente [112].

Anteriormente, otros autores ya testaron la eficacia antiproliferativa de la enzima DAO sobre líneas tumorales de diferente origen, utilizándola tanto como terapia génica [123,124,182] o enzimática, ya fuera libre [127], conjugada con PEG [125,126] o inmovilizada en NPM [128]. En los diferentes estudios también varió el origen de la DAO y, en consecuencia, el D-aminoácido empleado. En los trabajos en los que, al igual que en el presente, se evaluó la DAO obtenida de *R. gracilis*, se utilizó la D-Ala como sustrato [123,127,128,183]. La DAO porcina fue combinada con D-Pro [125,126], mientras que la enzima procedente de ratón se utilizó junto con D-Ser [124]. En cualquier caso, todos los trabajos mencionados fueron capaces de demostrar, en mayor o menor medida, la capacidad antiproliferativa de la enzima DAO, aunque sin profundizar en los mecanismos moleculares que median dicho efecto.

Una vez establecido el efecto de CLyTA-DAO y D-Ala sobre la proliferación de diferentes líneas celulares de CP, CCR y GBM con 72 horas de tratamiento, se realizaron análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo que concluyeron que el efecto inducido por CLyTA-DAO era principalmente citotóxico dado el aumento del porcentaje de células en la fase SubG₁ (**Figura 33**). Además, tal y como se había observado en los ensayos de MTT, las líneas celulares de GBM fueron menos sensibles al tratamiento que las de CP y CCR, ya que el aumento del porcentaje de células en SubG₁ en los GBM osciló entre un 15-30% mientras que en CP y CCR, a excepción de las líneas celulares resistentes a la muerte inducida por CLyTA-DAO, aumentó un 30-50% (**Figura 33**).

Los GBM son tumores muy agresivos cuya letalidad está asociada a la resistencia que suelen desarrollar frente a los tratamientos convencionales [184]. Las líneas celulares establecidas en el HGUE a partir de cultivos primarios no presentan mutación en *IDH1/2* [155]. Esta mutación suele encontrarse en pacientes con GBM secundarios, siendo muy rara en los GBM primarios, y está relacionada con una mayor supervivencia y sensibilidad a tratamientos como la quimio o la radioterapia [185]. Este hecho podría explicar el menor efecto inducido por CLyTA-DAO en comparación con las líneas celulares de CP y CCR.

En cuanto a las líneas celulares resistentes a la muerte inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO, el análisis del ciclo celular confirmó que la línea celular HT-29 era resistente, aunque también el porcentaje de muerte celular en Hs766T fue muy inferior al observado en las líneas celulares sensibles ($6,8 \pm 5,2\%$) (**Figura 33**). Con el fin de determinar si el menor efecto citotóxico observado en algunas líneas celulares (HT-29, Hs766T y T98) era una cuestión temporal, se repitió el análisis del ciclo celular utilizando tiempos más largos de tratamiento. En los casos de HT-29 y Hs766T, el porcentaje de células muertas aumentó con el tiempo de tratamiento, alcanzando aproximadamente un 20% de células muertas tras 72 horas de tratamiento (**Figura 34**), un porcentaje que seguía siendo muy inferior al observado en el resto de las líneas celulares de CP y CCR sensibles. En cambio, en T98 el aumento de la muerte celular fue más pronunciado alcanzando alrededor de un 55% de células muertas tras 72 horas de tratamiento (**Figura 34**).

En este punto, es importante mencionar que la línea celular HT-29 presenta una mutación en el gen *BRAF*, en concreto una sustitución en la valina 600 por ácido glutámico (V600E) [166,186,187]. El gen *BRAF* es un componente de la vía de señalización RAS-RAF, que regula la división celular a través de la interacción con factores de crecimiento extracelulares y con hormonas [188–190]. La mutación en este gen es común en varios tipos de tumores como el linfoma no-Hodking, el melanoma, el cáncer de tiroides, el carcinoma de células grandes de pulmón, el adenocarcinoma de pulmón y el CCR [191–197]. Concretamente, la mutación V600E se encuentra en aproximadamente el 10% de los pacientes con CCR [168]. Los pacientes con esta mutación presentan tumores más agresivos y una supervivencia general significativamente menor. Por ello, los fármacos convencionales utilizados en quimioterapia no son efectivos para el tratamiento de este tipo de tumores, únicamente la combinación de FOLFOXIRI (5-FU/LV + Oxaliplatino + Irinotecan) junto con bevacizumab ha demostrado ser efectiva [198,199]. La mutación V600E en *BRAF* ocurre en la región del gen que codifica el dominio quinasa, llevando a una activación constitutiva del gen y, por lo tanto, manteniendo la ruta de las MAPK continuamente activa, promoviendo el crecimiento, la proliferación, la diferenciación, la migración y la supervivencia de las células tumorales [200].

Los resultados obtenidos de los análisis del ciclo celular asocian la muerte celular con la fragmentación del ADN, de modo que se decidió utilizar un ensayo de viabilidad, que determina el porcentaje de muerte celular a través de la permeabilidad de la membrana plasmática, para corroborar los resultados. Por lo general, con el análisis de viabilidad los valores de muerte celular obtenidos fueron más altos que los observados en el ciclo celular y los perfiles de sensibilidad variaron ligeramente (**Figura 35**). Sin embargo, hay que destacar el resultado obtenido en la línea celular T98, ya que fue una de las líneas menos sensibles según el análisis del ciclo celular con un porcentaje de células muertas en torno al 20% (**Figura 33**), mientras que con el ensayo de viabilidad se observó aproximadamente un 70% de muerte celular (**Figura 35**), siendo este un nivel similar al obtenido en las líneas celulares de CP y CCR más sensibles a la muerte inducida por CLyA-DAO. El resultado sugiere que en la línea celular T98, el daño inducido por el tratamiento con CLyA-DAO se produce principalmente sobre la membrana plasmática y, los daños en

el ADN son un efecto tardío del tratamiento, tal y como se observó al analizar el ciclo celular tras 48 y 72 horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala (**Figura 34**).

Los resultados observados tanto en el análisis del ciclo celular como en el ensayo de viabilidad confirmaron que la línea celular Hs766T es resistente a la muerte inducida por CLytA-DAO. Esta línea celular es bastante resistente a otros tratamientos, como por ejemplo la GEM, 5-FU o cisplatino [201]. Además, a diferencia del resto de líneas celulares ensayadas, Hs766T no presenta mutación en TP53 [202,203], por lo que tiene una mejor respuesta a agentes que generan daños en el ADN [204,205]. Por otra parte, se conoce que Hs766T tiene un punto de control defectuoso de la mitosis [203].

Una vez determinada la efectividad del sistema CLytA-DAO/D-Ala para inducir muerte celular en modelos celulares de CP, CCR y GBM, se evaluó su toxicidad sobre las células no tumorales. Las células tumorales presentan altos niveles basales de ROS en comparación con las células sanas, debido a que su tasa metabólica es más elevada [206]. Este hecho conlleva que las células tumorales sean más sensibles al estrés oxidativo que las sanas, ya que el umbral a partir del cual se induce la muerte celular es más bajo. Para estudiar la toxicidad utilizamos modelos celulares no tumorales de linfocitos, adipocitos, fibroblastos y de páncreas. Al realizar el análisis del ciclo celular, no se observaron cambios significativos en la mayoría de las líneas celulares, con la excepción de la línea celular IMR90 de fibroblastos, en la que se produjo cerca de un 20% de muerte celular tras el tratamiento con CLytA-DAO (**Figura 36**). Las razones por las que el efecto de CLytA-DAO es menor en las células sanas se desconocen, aunque es posible que se deba a que la tasa de división celular es menor que en las células tumorales y, por lo tanto, el material genético está menos expuesto a las ROS. También se conoce que la mayoría de las células tumorales contienen cantidades más bajas de enzimas antioxidantes (GPX, SOD, catalasa,...) que las células sanas, lo que las convierte en más vulnerables frente a las ROS [207]. Por otra parte, la mayoría de las células tumorales presentan mutación en TP53, mientras que las células sanas tienen TP53 intacto, aportándoles una mayor protección frente a la inestabilidad genética inducida por las ROS. En algunos de los estudios realizados previamente con la DAO, se utilizaron líneas celulares no tumorales

de distinto origen demostrando que eran menos sensibles a la citotoxicidad inducida por el tratamiento que las tumorales [125,127].

5.2. La inmovilización en nanopartículas magnéticas aumenta la estabilidad de CLytA-DAO y en consecuencia su efecto citotóxico

Una de las principales dificultades de la terapia enzimática suicida es lograr que la enzima alcance el tumor en su forma activa y en una concentración suficiente para poder activar el profármaco en condiciones fisiológicas. La solución radica en el uso de nanopartículas para inmovilizar la enzima y dirigirla hacia el tumor.

Es importante que las nanopartículas utilizadas como transportadores de fármacos sean biocompatibles y estables en condiciones fisiológicas. Las propiedades de las nanopartículas dependen de los materiales y procedimientos de síntesis. Es posible diseñarlas con el objetivo de potenciar su selectividad hacia las células tumorales, conjugándolas con ligandos específicos, y controlar su tamaño para facilitar su distribución por el organismo. Anteriormente, se ha observado que las nanopartículas son capaces de atravesar algunas barreras biológicas como por ejemplo la barrera hematoencefálica, haciéndolas eficaces para el tratamiento de tumores cerebrales [208,209].

Aparte de su potencial en el campo de la biomedicina como tratamiento antitumoral, la DAO tiene más aplicaciones biotecnológicas, ya sea como biosensor, como mecanismo de resistencia a herbicidas o como biorreactor en la síntesis de cefalosporinas o α -cetoácidos [115]. Sin embargo, su baja estabilidad ha promovido numerosas investigaciones evaluando su inmovilización en diferentes soportes para aumentar su estabilidad frente a diferentes pH, temperaturas y frente al peróxido de hidrógeno [210–215]. La inmovilización de la DAO en NPM se ha realizado por métodos covalentes [216,217] y no covalentes, a través de interacciones de afinidad mediante el dominio de polihistidinas [215,218] o del sistema avidina/estreptavidina [219].

En este trabajo, se ha utilizado la enzima DAO unida al dominio CLytA, de unión a colina o derivados. El dominio CLytA ha permitido la inmovilización de la enzima en NPM funcionalizadas con DEAE, un compuesto químico similar a la colina. Algunas de las ventajas de las NPM incluyen la posibilidad de utilizar un campo magnético externo ya sea para dirigir a la enzima de forma específica hacia la región tumoral [220,221] o, en el caso de las nanopartículas superparamagnéticas (<50 nm), para aumentar su temperatura, bien para inducir la liberación controlada del fármaco o para producir una hipertermia en el tumor [222] y así potenciar el efecto terapéutico causado por el fármaco. En esta dirección, la FDA ya ha aprobado Nanotherm® para el tratamiento de los GBM, que está formado por nanopartículas de óxido de hierro de 15 nm de diámetro cubiertas con aminosilano [81,223]. Otra ventaja de este tipo de nanopartículas es que pueden ser visualizadas mediante RMI [224].

Una de las mayores dificultades de la inmovilización de enzimas es conseguir que la proteína se una de forma estable y mantenga su actividad. En este sentido, los métodos de inmovilización no covalentes tienen varias ventajas: son procesos suaves, no requieren la modificación de la proteína, reduciendo con ello el riesgo de que pierda su actividad o se desnaturalice y, en muchos casos, se trata de procesos reversibles que permiten reutilizar las nanopartículas.

En un estudio anterior, se evaluó la DAO inmovilizada covalentemente en NPM funcionalizadas con APTES [128]. Cabe destacar que las nanopartículas empleadas en dicho trabajo manifestaron citotoxicidad por sí mismas, a diferencia de las NPM utilizadas en este estudio (**Figura 37**). La ausencia de toxicidad de nuestro sistema permitiría concentrar masivamente la DAO inmovilizada en la región tumoral, sin problemas de efectos secundarios. Una ventaja del sistema NPM-CLytA-DAO es que la inmovilización no es covalente, de modo que el procedimiento es más sencillo y rápido, ya que sólo supone la incubación de la enzima con las nanopartículas y, además, permite la liberación controlada de la enzima mediante la adición de colina (**Figura 43**).

Para comparar la eficacia de la enzima inmovilizada con respecto a la observada con la enzima libre se realizaron ensayos de dosis-respuesta por MTT. Generalmente, los datos obtenidos, tras 72 horas de tratamiento, indican que el efecto antiproliferativo

inducido por la enzima inmovilizada en NPM es mayor que el observado por la enzima libre (**Figura 38, Tabla 12**). Aunque en algunas líneas celulares no se observaron grandes cambios a nivel de los valores de IC_{50} , sí que se observó que el porcentaje de inhibición de la proliferación celular al utilizar dosis bajas (0,025 y 0,25 U/mL) es mayor cuando la enzima está inmovilizada (**Tabla 12**).

En el caso de las líneas celulares de CP y CCR, que generalmente son más sensibles al tratamiento con CLytA-DAO, las diferencias entre el efecto antiproliferativo inducido por la enzima libre e inmovilizada en NPM fueron más pronunciadas al reducir el tiempo de los ensayos de MTT a 24 horas (**Figura 40, Tabla 13**). Además, el mayor efecto antiproliferativo generado por la enzima inmovilizada en NPM se debió a un aumento de la muerte celular en todas las líneas celulares, observándose diferencias significativas en IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-480 y HGUE-C-1 de CCR y HGUE-GB-18 y HGUE-GB-37 de GBM (**Figura 39**).

A continuación, se determinó el motivo por el que la enzima inmovilizada tenía un efecto más pronunciado que en su estado libre. Para ello, existían dos posibilidades: que el efecto se produjera más rápidamente o que, al aumentar la estabilidad de la enzima, ésta se mantuviera activa durante un tiempo más prolongado.

Al analizar el ciclo celular utilizando tiempos de tratamiento comprendidos entre 15 minutos y 1 hora, el efecto se produjo más rápidamente al utilizar la enzima inmovilizada, sin embargo, la diferencia sólo fue significativa en la línea celular IMIM-PC-2 (**Figura 41**), de modo que esto no explicaba el mayor efecto inducido por la DAO inmovilizada. En cambio, con el ensayo utilizado para analizar la estabilidad de la enzima, sí que se observó una drástica disminución del porcentaje de células muertas al aumentar el tiempo de preincubación a 37°C con la enzima libre, mientras que, con la enzima inmovilizada en NPM, este descenso se produjo más lentamente (**Figura 42**). Esto sugiere una rápida pérdida de actividad de la enzima libre al ser sometida a dicha temperatura, mientras que, inmovilizada en NPM, se mantiene más estable.

Se sabe que la estabilidad de la DAO de *R. gracilis* disminuye dramáticamente con temperaturas superiores a 30°C [225], y la temperatura de las células humanas suele estar alrededor de los 37°C. Una de las principales ventajas de la inmovilización es el aumento

de la estabilidad enzimática en un mayor rango de temperatura y pH [226,227]. De hecho, existen varios estudios que han aumentado la estabilización de la DAO a un mayor rango de temperaturas al inmovilizarla en diferentes soportes [215,216,219,228]. El pH en la región tumoral es inferior al existente en el resto del organismo, por lo que también se ha determinado el aumento de la estabilidad de la DAO en pH ácidos al inmovilizarla en soportes cargados positivamente [216], como sucede con las NPM utilizadas en el presente trabajo, mientras que disminuye cuando se inmoviliza en soportes cargados negativamente [215]. En esta dirección, en un estudio previo realizado con CLyTA-DAO se realizaron experimentos *in vitro* que demostraron que la inmovilización en estas NPM aumenta su estabilidad a temperaturas más elevadas y pH más ácidos [229], condiciones más similares a las que encontramos en la región tumoral.

Se evaluó igualmente la inmovilización de CLyTA-DAO en nanopartículas de oro. Estas nanopartículas se pueden unir a los grupos tiol y, esta propiedad se ha utilizado ampliamente para funcionalizarlas con aminoácidos y proteínas para su uso en biomedicina [230–232]. Estas nanopartículas presentan baja toxicidad, son potencialmente biodegradables, estables química y físicamente y fáciles de funcionalizar [233–236]. Su interés radica además, en las propiedades ópticas y eléctricas que presentan, las cuales dependen de la resonancia de plasmón de superficie (SPR), que implica la fluctuación e interacción de los electrones entre cargas positivas y negativas en la superficie [235,237]. Debido a la SPR, cuando las nanopartículas de oro se irradian a cierta longitud de onda, transforman la energía lumínica en calor, causando hipertermia o la ablación térmica [236]. Al inmovilizar la enzima CLyTA-DAO en las nanopartículas de oro, se observó que su actividad enzimática disminuyó drásticamente, posiblemente debido a que la unión a través de la afinidad del oro por los grupos tiol interfiera con la conformación de la enzima modificando su actividad, y aunque añadimos el volumen necesario de CLyTA-DAO para alcanzar las 2 U/mL de enzima, como en el resto de los tratamientos, el efecto fue inferior al observado con la enzima libre (**Figura 44**). Sin embargo, resulta de gran interés continuar investigando en la posibilidad de combinar el tratamiento con CLyTA-DAO con la hipertermia inducida por la SPR de las nanopartículas de oro.

Con el objetivo de analizar otro método de inmovilización, se procedió a la encapsulación de la CLytA-DAO en alginato, uno de los polímeros más ampliamente utilizados para encapsulación, debido a su alta versatilidad y biocompatibilidad y a que las cápsulas protegen el componente inmovilizado aumentando su estabilidad y biodisponibilidad [238]. Sin embargo, la CLytA-DAO encapsulada en alginato también tuvo un menor efecto en comparación con la enzima libre (**Figura 44**), quizá debido a que el atrapamiento pudiera interferir en la interacción entre la enzima y las células o porque parte del H₂O₂ producido quedase atrapado en la cápsula y no alcanzase las células.

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo confirman que la enzima CLytA-DAO es más eficaz si se encuentra inmovilizada en NPM debido a un aumento de su estabilidad en condiciones fisiológicas.

5.3. El estrés oxidativo inducido por CLytA-DAO causa daños en el ADN, membrana plasmática y en la membrana mitocondrial

La muerte causada por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala viene mediada por la inducción de estrés oxidativo. Durante la reacción catalizada por CLytA-DAO se produce peróxido de hidrógeno [110], una de las principales ROS. De hecho, los resultados obtenidos demostraron que el tratamiento es capaz de provocar un aumento intracelular de las ROS durante las primeras horas en todas las líneas celulares testadas (**Figura 45**).

Se conoce que un exceso de ROS en el interior celular genera daños tanto en las moléculas como en los orgánulos provocando finalmente la muerte celular. Debido al elevado requerimiento energético de las células tumorales, éstas presentan basalmente mayores niveles de ROS que las células sanas, lo que las hace más vulnerables a los tratamientos generadores de estrés oxidativo [206]. Posiblemente, este sea uno de los motivos por los que las células no tumorales son menos sensibles al tratamiento con CLytA-DAO (**Figura 36**).

Con el fin de analizar las consecuencias del exceso de ROS y su participación en la muerte celular inducida, se determinó el daño producido en el ADN, la membrana plasmática y las mitocondrias. Los análisis del ciclo celular y de viabilidad demostraron

que el tratamiento mantenido durante 24 horas sobre las células tumorales genera daños tanto en el ADN (**Figura 33**) como en la membrana plasmática (**Figura 35**). Sin embargo, estos datos no nos permiten discernir si la fragmentación del ADN y la permeabilización de la membrana plasmática son efectos tempranos causados por las ROS de forma directa o bien un efecto tardío, consecuencia del mecanismo de muerte celular inducido.

El daño en el ADN se estudió a través de la fosforilación de la histona H2A.X y, al igual que sucedió con las ROS intracelulares, se observó un aumento del daño en el ADN durante las primeras horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en todas las líneas celulares testadas (**Figura 46**). El daño inducido en la membrana plasmática se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando un marcaje con yoduro de propidio, un compuesto fluorescente impermeable a la membrana plasmática (**Figura 47**), y a través del ensayo de LDH (**Figura 48**). Inicialmente, se determinó que 6 horas de tratamiento son suficientes para causar daños en la membrana plasmática. Las líneas celulares en las que el efecto fue más evidente son IMIM-PC-2 y RWP-1 de CP, SW-620 de CCR y T98 de GBM. En SW-480 de CCR también se observó ruptura de la membrana plasmática, aunque más leve, indicando que el efecto en esta línea celular es más tardío. En cambio, en las líneas celulares de GBM derivadas de cultivos primarios (HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39) no se llegó a producir la ruptura de la membrana plasmática, sugiriendo una muerte celular no necrótica. Aunque los resultados fueron replicados con ambas metodologías, en la línea celular IMIM-PC-2 de CP, se observaron grandes cambios con el marcaje con yoduro de propidio (**Figura 47**), mientras que con el ensayo de LDH no se produjeron cambios significativos (**Figura 48**), lo que sugiere que esta línea celular no es compatible con el ensayo de LDH, existiendo la posibilidad de que tenga inhibida la actividad y/o la expresión de esta enzima.

Por otra parte, el estrés oxidativo puede causar la despolarización de la membrana mitocondrial tanto de forma directa como indirecta. Se conoce que una acumulación de ROS puede producir la oxidación de los residuos tiol del translocador de nucleótidos de adenina (ANT), una proteína encargada de intercambiar el ADP/ATP a través de la membrana mitocondrial interna [239]. Esta proteína es un componente esencial del poro de transición de permeabilidad (PTP), y su oxidación induce la apertura

del PTP y el colapso del PMM [239]. A su vez, las ROS afectan a la homeostasis del calcio, pudiendo provocar su salida del RE a través del receptor inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R), su acumulación en el citosol y, su posterior entrada a las mitocondrias, induciendo la despolarización de la membrana mitocondrial y aumentando la producción mitocondrial de ROS [160,240,241].

En este trabajo, se estudió tanto el descenso del PMM como la participación del calcio intracelular en la muerte inducida por CLytA-DAO. Aunque en todas las líneas celulares sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO se observó la despolarización de la membrana mitocondrial con tiempos cortos de tratamiento (**Figura 49**), no en todos los casos este descenso estuvo ligado a la movilización del calcio (**Figura 50**). Al quelar el calcio intracelular antes del tratamiento con CLytA-DAO, se produjo una disminución significativa de la muerte celular en RWP-1 de CP, SW-480 y SW-620 de CCR y HGUE-GB-37 de GBM, mientras que no hubo cambios significativos en IMIM-PC-2 de CP y HGUE-GB-39 de GBM (**Figura 50**). En ninguno de los casos, hubo cambios significativos en la muerte inducida por CLytA-DAO al bloquear el calcio extracelular (**Figura 50**).

Los daños en el ADN, la membrana plasmática y en la membrana mitocondrial, que finalmente inducen la muerte de las células tumorales, se producen como consecuencia de la producción de H₂O₂ durante la reacción de oxidación catalizada por la enzima. Por ello, se evaluó si el efecto inducido por la enzima era equivalente a la adición externa de H₂O₂. Inicialmente, se realizaron ensayos de MTT para determinar la dosis de H₂O₂ que inducía una inhibición de la proliferación celular similar a la observada con CLytA-DAO. Los resultados determinaron que 600 µM de H₂O₂ producía un efecto antiproliferativo similar al observado con 2 U/mL de CLytA-DAO y 1 mM de D-Ala durante 72 horas (**Figura 51**). Sin embargo, tras estos primeros análisis ya se observaron diferencias con respecto al tratamiento con CLytA-DAO, ya que los patrones de sensibilidad observados fueron bastante diferentes (**Figura 51, Tabla 14**).

A continuación, las líneas celulares se trataron con 600 µM de H₂O₂ durante 24 horas para analizar la distribución en el ciclo celular y la viabilidad. CLytA-DAO tiene un efecto marcadamente citotóxico sobre la mayoría de las líneas tumorales estudiadas (**Figura 33**), en cambio, el principal efecto inducido por H₂O₂ en la mayoría de las líneas

celulares fue un bloqueo en la fase G_2/M , con la excepción de HGUE-GB-18, en la que sí que se observó un aumento del porcentaje de células en fase $SubG_1$ (**Figura 52**), que además fue equivalente al observado con CLytA-DAO. En este estudio, se volvieron a repetir patrones de sensibilidad diferentes a los observados con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala. Líneas celulares como Hs766T y HT-29, resistentes al efecto citotóxico inducido por CLytA-DAO (**Figura 33**), mostraron un claro efecto citostático al ser tratadas con H_2O_2 (**Figura 52**), mientras que otras como IMIM-PC-2, RWP-1 o SW-480, que son muy sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO (**Figura 33**), no sufrieron grandes variaciones en el ciclo celular al recibir el tratamiento con H_2O_2 (**Figura 52**). Aumentando el tiempo de tratamiento a 48 y 72 horas, tampoco se llegaron a observar efectos similares a los inducidos por CLytA-DAO. Tras 72 horas de tratamiento, en Hs766T se mantuvo el efecto citostático, mientras que en IMIM-PC-2 se llegó a producir un aumento de la fase $SubG_1$, aunque se mantuvo por debajo del 15% (**Figura 54**).

Los análisis de viabilidad mostraron que la ruptura de la membrana plasmática se producía principalmente en RWP-1 de CP y SW-480 de GBM (**Figura 53**), aunque en ningún caso se alcanzaron los niveles observados con CLytA-DAO y D-Ala (**Figura 35**). El efecto antiproliferativo de H_2O_2 ya había sido descrito previamente, tras 24 horas de tratamiento en células de cáncer de pulmón (Calu-6 y A549) y cáncer cervical (HeLa) con valores de IC_{50} de aproximadamente 50 μM , 100 μM y 75 μM , respectivamente [242,243]. Sin embargo, en dichos estudios se observó que dosis inferiores a 100 μM producían un aumento en la fase $SubG_1$ y, análisis con azul de tripán confirmaron el aumento de células muertas con dosis por encima de 100 μM [242,243].

Las diferencias observadas entre los efectos inducidos por CLytA-DAO/D-Ala y H_2O_2 podrían explicarse por la cinética de aumento de las ROS. Por lo general, el tratamiento con H_2O_2 causó un aumento más elevado y rápido de los niveles de ROS en el interior celular que CLytA-DAO, pero el descenso también se produjo más rápidamente (**Figura 55**). Esto se debe a que la enzima va a producir ROS de forma constante hasta que pierda por completo su actividad. Por lo tanto, se puede deducir que esta producción lenta y continuada de ROS es la responsable del efecto diferencial observado entre CLytA-DAO y la adición directa y puntual de H_2O_2 .

En conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala causa un aumento continuado de ROS en el interior celular, durante el tiempo que la enzima mantiene su actividad, que conlleva daños en el ADN y da lugar a la despolarización de la membrana mitocondrial. Sin embargo, los resultados obtenidos al analizar la ruptura de la membrana plasmática y la movilización del calcio intracelular sugieren que este tratamiento es capaz de activar diferentes mecanismos de muerte en función del contexto celular.

5.4. CLytA-DAO activa diferentes mecanismos de muerte dependiendo del contexto celular

Para convertir el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en una estrategia terapéutica frente al cáncer, es importante determinar el mecanismo de inducción de muerte celular. Para comenzar, las diferentes líneas celulares de CP, CCR y GBM se trataron con CLytA-DAO y D-Ala en combinación con inhibidores de diferentes tipos de muerte celular. Se utilizó el Z-VAD-FMK, un inhibidor general de caspasas, para bloquear la muerte por apoptosis (**Figura 56A**), la cloroquina y la espautina-1, como inhibidores de la autofagia (**Figura 56B**), la necrostatina-1 frente a la necroptosis (**Figura 56C**) y la ferrostatina-1 para inhibir la muerte por ferroptosis (**Figura 56D**).

Con ninguno de los inhibidores se produjeron cambios en la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en las líneas celulares de CP y CCR testadas. En cambio, se observó un descenso significativo de la muerte celular inducida por CLytA-DAO al utilizar el inhibidor general de caspasas en las líneas celulares de GBM, sugiriendo que en este tipo de tumor se activa la muerte celular por apoptosis. Estos datos coinciden con los resultados observados al estudiar la ruptura de la membrana plasmática (**Figura 47, Figura 48**). Al evaluar el efecto de CLytA-DAO a tiempos cortos, ya se observó que existían diferencias en el mecanismo de muerte inducido por CLytA-DAO entre las líneas celulares de CP y CCR y las de GBM. En dicho estudio se observó que en las líneas celulares IMIM-PC-2 de CP y SW-480 de CCR, el efecto inicial inducido por CLytA-DAO era

citostático, observándose un aumento significativo de las células en la fase G₂/M, mientras que en HGUE-GB-18 de GBM el efecto era directamente citotóxico (**Figura 41**).

Para confirmar la muerte apoptótica en los GBM, se realizó un ensayo de Anexina V durante las primeras horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala, en el que se observó un aumento significativo del porcentaje de células positivas para la Anexina V (**Figura 57**), indicativo de que se ha producido la externalización de la PS, una de las principales características de la apoptosis. Los dos principales tipos de apoptosis son los activados por la vía extrínseca e intrínseca. Sin embargo, la disminución del PMM observada (**Figura 49**), sugería que se trataba de una apoptosis intrínseca. Este tipo de apoptosis normalmente se activa por estrés oxidativo, daños en el ADN y una sobrecarga de calcio en el interior celular. Además, en la apoptosis intrínseca, la pérdida del PMM causa la liberación de proteínas como AIF, EndoG, citocromo c, Smac, Omi, etc. Seguidamente, AIF y EndoG se dirigen al núcleo donde inducen la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN [244]. Los resultados de la inmunocitoquímica de AIF mostraron que se producía la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo en las primeras horas de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala en las líneas celulares de GBM (**Figura 59**). Este dato junto con el hecho de que los inhibidores de Bax y de caspasa-8 tuvieron un efecto muy leve sobre la muerte inducida (**Figura 58**), confirman que el principal mecanismo de muerte activado por CLyTA-DAO en los GBM es una apoptosis intrínseca.

En las líneas celulares de CP y CCR, a diferencia de los GBM, sí que se produjo la ruptura de la membrana plasmática durante las primeras horas de tratamiento (**Figura 47, Figura 48**), y la muerte celular no fue bloqueada por ninguno de los inhibidores testados (**Figura 56**). Además, en todas ellas se produjo la despolarización de la membrana mitocondrial (**Figura 49**) y, en muchos casos, la muerte estuvo ligada a la movilización del calcio intracelular (**Figura 50**). En conjunto, todos los datos sugerían una necrosis inducida por la TPM (*MPT-driven necrosis*, en inglés) [129].

Para continuar profundizando en el mecanismo de muerte celular se evaluó el papel de PARP-1. Se sabe que PARP-1 tiene una doble función en la respuesta al daño en el ADN (*DNA damage response*, DDR). La DDR comprende una compleja ruta de transducción de señales que se activa cuando se han producido daños en el ADN y se

encarga de iniciar la respuesta a dicho daño. Por una parte, cuando los daños son leves, PARP-1 participa en el sistema de reparación de escisión de bases del ADN, pero cuando el daño en el ADN es muy elevado, se produce una sobre-activación de PARP-1, que conlleva a la acumulación citotóxica del polímero PAR en el citosol, que activa la muerte conocida como *parthanatos* [135]. *Parthanatos* es un tipo de muerte celular similar a necrosis que se activa por un daño excesivo en el ADN y que se ha relacionado con el estrés oxidativo [240,245]. Esta forma de muerte celular se caracteriza por la sobre-activación de PARP-1, la acumulación de PAR en el citosol, la externalización de la PS, la movilización del calcio intracelular, la despolarización de la membrana mitocondrial, la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo y la condensación de la cromatina [135,245].

Los resultados obtenidos al combinar el tratamiento CLyTA-DAO con DPQ, un inhibidor de PARP-1 (**Figura 60**), y al determinar la localización de AIF por inmunocitoquímica (**Figura 61**) revelaron diferentes mecanismos de muerte en las líneas celulares de CP y CCR, tal y como se detalla a continuación.

En la línea celular RWP-1 de CP se produjo una disminución significativa de la muerte celular inducida por CLyTA-DAO y D-Ala al utilizar el inhibidor de PARP-1 (**Figura 60**) y la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo (**Figura 61**). Además, en esta línea celular también se había asociado la despolarización de la membrana mitocondrial (**Figura 49**) con la movilización intracelular del calcio (**Figura 50**). Se conoce que la movilización del calcio del RE a la mitocondria es la causante de la despolarización de la membrana mitocondrial y que este proceso induce una mayor liberación de las ROS por parte de la mitocondria [246]. Otros autores han relacionado este proceso con la muerte celular por *parthanatos* [240]. En conclusión, los resultados obtenidos en la línea celular RWP-1 sugieren que el mecanismo de muerte celular inducido por CLyTA-DAO es *parthanatos*.

En cambio, en la línea celular IMIM-PC-2 de CP el tratamiento con el inhibidor de PARP-1 no produjo cambios significativos en la muerte inducida por CLyTA-DAO (**Figura 60**). Los resultados de la inmunocitoquímica también indicaron que AIF no llega a entrar al núcleo, sino que se mantiene en la región perinuclear (**Figura 61**). Otros investigadores han descrito un tipo de muerte celular programada independiente de caspasas en la que

AIF se libera de la mitocondria y se acumula en la región perinuclear colocalizado con la cromatina en las primeras fases [247–249].

Finalmente, en las líneas celulares SW-480 y SW-620 se observó el efecto protector del inhibidor de PARP-1 (**Figura 60**), la participación del calcio intracelular (**Figura 50**), la despolarización de la membrana mitocondrial (**Figura 49**) y la ruptura de la membrana plasmática (**Figura 47, Figura 48**) pero los resultados de la inmunocitoquímica no mostraron un claro aumento de AIF en el núcleo (**Figura 61**). Es posible que en estas líneas celulares sea necesario un mayor tiempo de tratamiento para que se produzca la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo. Sin embargo, en este sentido también ha habido autores que han descrito una muerte celular causada por estrés oxidativo, dependiente de PARP-1, de la movilización de calcio y de la despolarización de la membrana mitocondrial, pero independiente de AIF [245].

En la **Figura 92** se muestra un esquema general de la muerte celular inducida por CLytA-DAO. Inicialmente, la reacción catalizada por CLytA-DAO al oxidar la D-Ala produce H_2O_2 , un potencial productor de ROS. Las ROS entran en el interior celular (1) y su acumulación (2) causa daños en el ADN de forma directa (3) y la liberación del calcio del RE al citosol (3) a través de los canales IP3R (4). El calcio liberado se dirige hacia la mitocondria (5), causando la despolarización de la membrana mitocondrial (6) y, consecuentemente, promoviendo una producción adicional de ROS (7). La disminución del PMM está además relacionada con la salida de proteínas desde la mitocondria que finalmente causan la condensación de la cromatina y la fragmentación del ADN, como AIF, citocromo c, EndoG, etc. (7). Por otra parte, cuando el daño inducido por las ROS en el ADN es muy elevado, se produce una sobre-activación de PARP-1 (4) que induce la acumulación del polímero PAR en el citosol (5), el cual también causa la traslocación de AIF de la mitocondria al núcleo (6). Finalmente, los resultados obtenidos en IMIM-PC-2 sugieren que las ROS son capaces de actuar directamente sobre la membrana mitocondrial por un mecanismo de momento desconocido (?), ya que en esta línea celular se observa la despolarización de la membrana mitocondrial pero el calcio no parece tener un papel en la muerte celular. Es posible que la oxidación de la proteína ANT del PTP,

descrita anteriormente, sea la responsable de la despolarización de la membrana mitocondrial en IMIM-PC-2.

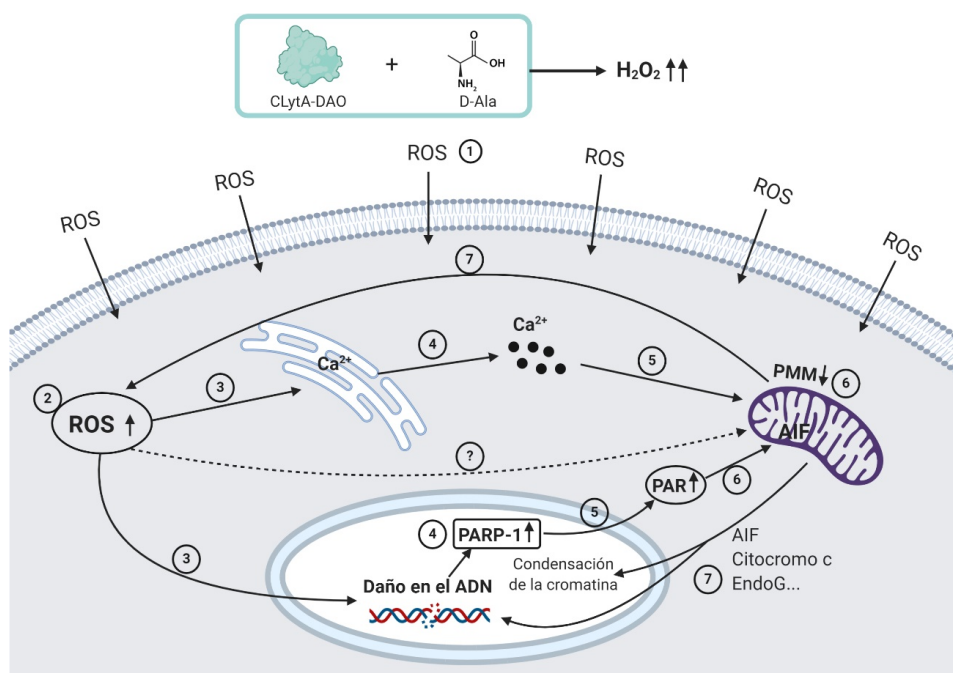


Figura 92. Mecanismo general de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala. Creado con Biorender.com

Con el fin de continuar profundizando en el mecanismo de muerte celular inducido por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala, se estudió el papel de la ruta de transducción de señales de las MAPKs en diferentes modelos celulares. La ruta de señalización de las MAPKs está relacionada con la regulación de varios procesos biológicos y normalmente se encuentra alterada en condiciones patológicas como el cáncer [250]. Como ya se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo genera daños en el ADN, que activan la DDR, la cual normalmente está regulada por las MAPKs [251]. Las MAPKs de mamíferos incluyen las ERKs, las JNKs y las p38. Las ERKs están involucradas en la respuesta mitogénica y se relacionan principalmente con la proliferación celular, supervivencia y diferenciación [138]. En cambio, las JNK y p38 se activan en respuesta al estrés y participan en varios procesos biológicos entre los que encontramos la supervivencia, muerte celular, procesos inflamatorios, etc. [140,252].

En primer lugar, se determinaron los niveles de fosforilación de las tres MAPKs mencionadas, durante los primeros minutos de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en dos líneas celulares de CP, una sensible a la muerte (IMIM-PC-2) y otra resistente (Hs766T). En la línea celular IMIM-PC-2 se produjo la activación de las tres MAPK, siendo ésta más pronunciada en JNK y p38 (**Figura 62**). En cambio, en Hs766T los cambios tras el tratamiento fueron muy leves, observándose un aumento en la activación de JNK y una disminución en p38, sin detectarse cambios en los niveles de fosforilación de las ERK (**Figura 62**).

Para evaluar el impacto de estas modificaciones en la muerte inducida por CLytA-DAO en las líneas celulares de CP, CCR y GBM, se combinó el tratamiento con CLytA-DAO con inhibidores de las ERK, JNK y p38. Ni el inhibidor de ERK (AZD6244), ni el de JNK (SP600125) produjeron cambios significativos en la muerte inducida por CLytA-DAO (**Figura 63A, B**). Estos datos sugieren que la sobre-activación de JNK observada en IMIM-PC-2 se debe probablemente a un intento inicial de las células por sobrevivir y reparar el daño causado por el tratamiento. En cambio, la inhibición de p38, aumentó significativamente la muerte celular en la mayoría de las líneas celulares testadas (**Figura 63C**), lo que sugiere un papel protector de p38 frente a la muerte inducida por CLytA-DAO. Este dato coincide con estudios previos que relacionan la ruta de señalización de p38 con un mal pronóstico y con resistencia a varios fármacos como el tamoxifeno y el trastuzumab utilizados en cáncer de mama, la terapia de privación de andrógenos en cáncer de próstata, el gefitinib en cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cisplatino en CP, etc. [253].

5.5. La resistencia a la muerte celular inducida por CLytA-DAO/D-Ala está relacionada con mecanismos de detoxificación y supervivencia celular

Una vez determinado el mecanismo de muerte celular inducido por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, se decidió evaluar el mecanismo por el cual algunas de las líneas celulares son resistentes a la muerte inducida por el tratamiento. Las principales líneas

celulares resistentes al efecto citotóxico de CLytA-DAO son las Hs766T de CP y las HT-29 de CCR. Puesto que los efectos de CLytA-DAO responsables de la muerte celular eran el aumento intracelular de las ROS, el daño en el ADN y la despolarización de la membrana mitocondrial, se analizaron estos tres factores en las líneas celulares resistentes.

En cuanto a la línea celular Hs766T, el aumento intracelular de las ROS fue muy similar al observado en otras líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO (**Figura 45A, Figura 64**). El porcentaje de fosforilación de la histona H2A.X tras 3 horas de tratamiento, fue ligeramente inferior en Hs766T en comparación con IMIM-PC-2 y RWP-1 (**Figura 46A, Figura 65**). Con respecto a la disminución del PMM, sí que se observó que la despolarización era significativamente menor a la observada en las líneas celulares sensibles a la muerte (**Figura 49, Figura 66**). En el caso de HT-29 de CCR, apenas se observó aumento de las ROS tras 2 horas de tratamiento con CLytA-DAO (**Figura 64**) en comparación con el resto de las líneas celulares (**Figura 45**). El porcentaje de H2A.X fosforilada también fue inferior al observado en las líneas celulares de CCR sensibles a la muerte inducida por CLytA-DAO (**Figura 46, Figura 65**). Sin embargo, contrariamente a lo observado en Hs766T, no se produjeron cambios significativos al comparar la despolarización de la membrana mitocondrial con las líneas celulares sensibles (**Figura 49, Figura 66**).

En conjunto, estos datos sugieren la existencia de dos mecanismos de resistencia diferentes en ambas líneas celulares, puesto que en Hs766T existe una menor despolarización de la membrana mitocondrial, pero no hay diferencias significativas en la producción de radicales libres y el aumento del daño en el ADN, mientras que en HT-29, ocurre lo contrario. De este modo, el mecanismo de resistencia de Hs766T debe basarse más en la respuesta y reparación de los daños causados por las ROS mientras que el de HT-29 estaría más relacionado con la detoxificación.

En este punto hay que volver a remarcar que la línea celular Hs766T es altamente resistente a otros tratamientos [201] y que, a diferencia del resto de líneas celulares utilizadas, no tiene mutación en TP53 [202,203], lo que le proporciona una mejor capacidad de respuesta frente a los fármacos que inducen daño en el ADN [204,205].

En Hs766T, al igual que sucede en algunas de las líneas celulares sensibles a la muerte inducida por CLyTA-DAO y D-Ala, se observó que p38 ejercía un papel protector frente al estrés inducido por el tratamiento (**Figura 67**). P38 es una de las MAPKs relacionada con la respuesta a estrés oxidativo y los procesos inflamatorios. En esta misma dirección está el factor de transcripción NF-κB, regulado positivamente por p38, y relacionado con la supervivencia e inflamación [254,255]. Curiosamente, tras 1 hora de tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala, Hs766T mostró niveles de fosforilación de NF-κB muy superiores en comparación a los observados en IMIM-PC-2 y RWP-1, sensibles a la muerte inducida por el tratamiento (**Figura 68A**). En concordancia con este resultado, la inhibición de NF-κB resultó en una potenciación significativa de la muerte celular en Hs766T (**Figura 68B**).

Otra vía de señalización activada en respuesta al estrés es la de Nrf2. En condiciones normales, Nrf2 se encuentra unido a Keap1 y, cuando las células se exponen a una situación de estrés, el dímero se separa y Nrf2 se dirige hacia el núcleo para activar la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante [256]. Otros autores observaron que la separación de Nrf2 y Keap1 se produce tras la fosforilación de Nrf2, normalmente provocada por ERK y p38 [257]. *NFE2L2* es el gen codificante de Nrf2 y se encuentra basalmente más expresado en Hs766T que en el resto de las líneas celulares de CP sensibles a la muerte inducida por CLyTA-DAO (**Figura 69A**). El bloqueo de la expresión de *NFE2L2*, mediante la transfección con un siRNA (**Figura 69B**), seguido por el tratamiento con CLyTA-DAAO y D-Ala aumentó la muerte celular inducida (**Figura 69C**). Aunque se ha descrito una relación inversa entre Nrf2 y NF-κB [258], los resultados obtenidos en este estudio revelan que la alta expresión y/o activación de ambas son necesarias para proteger a las células frente al efecto de CLyTA-DAO.

Con respecto a la expresión de *NFE2L2*, cabe destacar que la línea celular T98 mostró una expresión del 320% con respecto a la observada en Hs766T (**Figura 82**). Aparte del papel antioxidante de Nrf2, también ha sido demostrado su papel en la reparación del ADN [259], lo que explicaría las diferencias observadas en T98 al comparar el efecto inducido por CLyTA-DAO en el ciclo celular y en el ensayo de viabilidad. La elevada

expresión de *NFE2L2* estaría protegiendo a las células de la fragmentación del ADN, pero no de los daños inducidos en la membrana plasmática.

Nrf2 regula positivamente a proteínas antioxidantes, entre las que encontramos OGG1 [162] y a MRP1, codificada por el gen *ABCC1* [163], ambas implicadas en mecanismos relacionados con la resistencia a fármacos. Ambos genes se encuentran altamente expresados en Hs766T (**Figura 69A,B**).

Para profundizar en el mecanismo de detoxificación, se determinó la expresión de catalasa, la principal enzima antioxidante. Curiosamente, se observó una sobreexpresión basal de catalasa en Hs766T, pero no en el resto de las líneas celulares testadas (**Figura 71A, Figura 88**) y, la transfección con un siRNA frente a la catalasa bloqueó significativamente su expresión (**Figura 71B**), lo que resultó en un aumento significativo de la muerte celular inducida por CLyTA-DAO (**Figura 71C**).

En general, los resultados sugieren que en Hs766T no se produce la movilización del calcio intracelular y el consecuente descenso del PMM y, además, la resistencia viene mediada por la alta expresión y/o activación de p38, NF- κ B, Nrf2 y catalasa. Estos factores están relacionados con el estrés en el RE, lo que sugiere que Hs766T tiene un mayor estrés basal en el RE que el resto de las líneas celulares, y este es el causante de su resistencia al estrés oxidativo inducido por el tratamiento con CLyTA-DAO y D-Ala.

La relación entre los genes mencionados y el estrés en el RE se ha representado en la **Figura 93**. Anteriormente, otros investigadores describieron una relación entre el estrés en el RE y la resistencia a fármacos utilizados frente al cáncer de mama [260], leucemia mielógena crónica [261] y el melanoma cutáneo [262]. La quinasa del RE de tipo proteína quinasa activada por ARN (PERK), la enzima 1 α que precisa inositol (IRE1 α) y el factor activador de la transcripción 6 (ATF6) son las principales proteínas activadas en condiciones de estrés en el RE. Sin embargo, la mayoría de estudios apuntan a IRE1 como el principal responsable de la resistencia a fármacos mediada por estrés en el RE [261,262]. ATF6 migra al aparato de Golgi y sufre una activación proteolítica por las proteasas S1P y S2P. El ATF6 procesado induce la expresión de *XBP-1*, que sufre un *splicing* para convertirse en su forma activa mediante la acción de IRE1 y, a continuación, se trasloca al núcleo, donde induce la transcripción de varios genes. Existen autores que han

relacionado positivamente XBP-1 con la expresión de catalasa [164]. Los niveles de expresión de *XBP-1* con y sin *splicing* aumentan significativamente en Hs766T tras el tratamiento con CLytA-DAAO (**Figura 72**). Adicionalmente, IRE1 recluta al factor 2 asociado al receptor del TNF (TRAF2) para activar proteínas relacionadas con la respuesta a estrés e inflamación, como p38, JNK y NF- κ B [260]. Finalmente, PERK fosforila a Nrf2 y al factor 2 α de iniciación eucariótica (EIF2 α), el cual promueve la traducción de ATF4 [263,264]. Nrf2 y ATF4 son factores de transcripción que regulan la expresión de genes relacionados con la respuesta antioxidante. Los datos recopilados hasta el momento sugieren que existe una relación entre el mecanismo de resistencia de Hs766T y el estrés basal en el RE, sin embargo, son necesarios más estudios para poder confirmarlo.

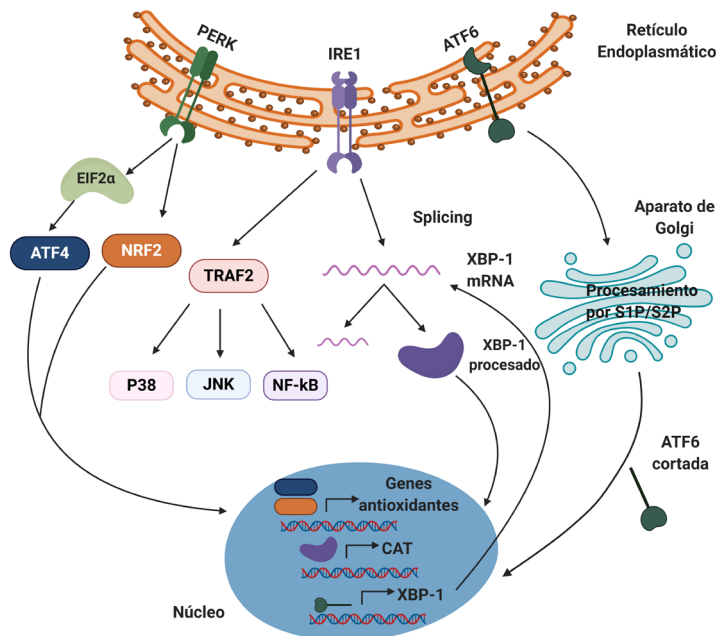


Figura 93. Relación entre algunos de los genes involucrados en la resistencia a la muerte inducida por CLytA-DAO y Hs766T y el estrés en el RE. Creado con Biorender.com

En la línea celular HT-29 de CCR, tal y como sucedió con Hs766T, el porcentaje de muerte celular aumentó al combinar el tratamiento con CLytA-DAO con el inhibidor de P38 (**Figura 67**) y con NF- κ B (**Figura 73**), aunque sólo en el segundo caso el aumento fue

significativo. No obstante, el resto de los genes implicados en la resistencia de Hs766T no parecen jugar un papel en la resistencia de HT-29 (**Figura 74**).

Otros estudios habían descrito una relación entre la expresión del gen *GPX2* y la supervivencia de HT-29 [165,167]. *GPX2* es una enzima antioxidante y su expresión demostró estar elevada en HT-29 y SW-620 (**Figura 75A**), a pesar de que esta última no es resistente a la muerte celular inducida por CLytA-DAO. Además, al bloquear la expresión de *GPX2* en HT-29 antes de añadir el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, el efecto citotóxico aumentó significativamente (**Figura 75B,C**).

La mutación V600E en el gen *BRAF*, presente en HT-29, como ya he mencionado anteriormente, es considerada un marcador de mal pronóstico que induce la resistencia a varios tratamientos [166,265,266]. Sin embargo, la inhibición de *BRAF* con sorafenib, aumentó la muerte celular inducida por CLytA-DAO en HT-29 y en SW-480, sugiriendo que la mutación no es responsable de esta resistencia (**Figura 76**).

En conjunto, en HT-29 se ha observado una potenciación de la muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO al inhibir p38 (**Figura 67**) y NF- κ B (**Figura 73**), lo que indica una posible relación con la respuesta inflamatoria, y al bloquear la expresión de *GPX2* (**Figura 75**), sugiriendo un papel de la respuesta frente al estrés oxidativo. Se ha demostrado además, que el sorafenib es un inhibidor de *BRAF* poco selectivo y una de sus dianas es p38 [171], lo que explicaría el aumento de la muerte celular observado en ambas líneas celulares. En futuros estudios, se bloqueará la expresión de *BRAF* mediante un siRNA para poder confirmar o descartar su participación en la resistencia de HT-29.

5.6. CLytA-DAO puede utilizarse para potenciar el efecto de otros tratamientos antitumorales

Cada vez es más común combinar diferentes terapias para el tratamiento de tumores ya que la monoterapia no siempre es efectiva y, en muchos casos, el aumento de dosis puede resultar en la aparición de efectos secundarios que incluso pueden provocar la muerte del paciente. Por otra parte, si en lugar de aumentar la dosis de

fármaco se aumenta el tiempo de tratamiento, ya sea con radioterapia o quimioterapia, se desarrollan resistencias y disminuye la eficacia. Por ello, es muy importante el estudio de la combinación de diferentes tratamientos para descubrir si los efectos de ambos se complementan. Esto permitiría disminuir tanto la dosis como el tiempo de tratamiento, aliviando los efectos secundarios y evitando el desarrollo de resistencias por parte de las células tumorales. En clínica, es común utilizar diferentes combinaciones de radioterapia, quimioterapia (con uno o múltiples fármacos), e incluso inmunoterapia.

Al igual que el tratamiento con CLytA-DAO, la radioterapia causa daños en el ADN que provocan la muerte celular al no poder ser reparados por las células, además, al entrar en contacto con las moléculas de agua se produce su ionización generando radicales libres. Tanto los resultados de este trabajo como los de estudios anteriores realizados en el laboratorio indican que el efecto de 7 Gy de radioterapia es, generalmente, citostático, bloqueando el ciclo celular en la fase G₂/M (**Figura 77A**, [173]). Al combinar la radioterapia con 1 U/mL de CLytA-DAO se logró potenciar la muerte celular tanto en RWP-1 de CP como en HGUE-GB-18 de GBM (**Figura 77B**).

El BCNU es un agente alquilante del ADN que bloquea la síntesis de ácidos nucleicos induciendo un bloqueo en el ciclo celular y, finalmente, la apoptosis. Se utiliza principalmente en el tratamiento de tumores cerebrales y su nombre comercial es Gliadel[®], que consiste en obleas formadas por un copolímero biodegradable que contienen el BCNU. Este fármaco se sitúa en la cavidad quirúrgica y libera de forma controlada el fármaco en la región tumoral, evitando una toxicidad sistémica. El Gliadel se utiliza normalmente como un tratamiento adyuvante durante el periodo de tiempo existente entre la resección quirúrgica del tumor y la aplicación de quimioradioterapia [267]. Se han demostrado beneficios al combinar el tratamiento con BCNU y TMZ debido a que la TMZ depleciona una enzima reparadora del ADN, responsable de la resistencia a nitrosoureas, como el BCNU. En concreto, uno de los enfoques terapéuticos que han demostrado ser seguros y efectivos en este tipo de tumores es la cirugía, seguida del tratamiento con las obleas de BCNU y, a continuación, la combinación de quimioterapia con TMZ y radioterapia [268,269]. Por otra parte, en pacientes con un GBM recurrente se ha demostrado que la combinación de BCNU con

Fotemustina, otro agente citotóxico alquilante del grupo de nitrosoureas, es eficaz aunque muestra toxicidad [270].

El efecto producido por el BCNU en líneas celulares de GBM fue citotóxico y citostático, causando un bloqueo en la fase G₂/M (**Figura 78A**). Concretamente, en la línea celular T98 se logró observar un efecto sinérgico en la muerte celular al combinar BCNU con CLytA-DAO y D-Ala (**Figura 78B**).

Hasta ahora se ha mencionado la combinación de diferentes tratamientos convencionales que ejercen un efecto citotóxico para observar sinergia entre ellos. Sin embargo, otra opción para reducir los efectos adversos y resistencias es combinar un agente citotóxico con otro tipo de moléculas inhibitoras, con el objetivo de potenciar el efecto. En esta dirección, otros autores evaluaron en células de glioma de rata el tratamiento con DAO en combinación con 3-bromopiruvato, un inhibidor de la hexoquinasa II que interfiere con el efecto Warburg, causando una disminución de los recursos energéticos de las células tumorales [124]. Se conoce que la hexoquinasa es un antioxidante preventivo [271], de modo que al inhibirla con el 3-bromopiruvato potenciaría el daño generado por los ROS.

En el presente trabajo se ha evaluado la combinación con los inhibidores de HDAC que, al inhibir los grupos acetilo de las mismas, actúan como represores transcripcionales. Algunos de los inhibidores de HDAC aprobados para su uso en clínica son SAHA (Vorinostat, 2006) [272], FK228 (Romidepsina, 2009) [273], PXD101 (belinostat, 2014) [274] y panobinostat (Farydak, 2015) [275]. Ninguno de estos inhibidores ha demostrado ser efectivo utilizado como monoterapia en tumores sólidos, sino que la mejor opción es utilizarlos con otros agentes, cuya combinación tenga efectos sinérgicos o aditivos. En estudios *in vitro* se ha demostrado que los inhibidores de HDAC disminuyen la capacidad de reparar el daño en el ADN, ya que alteran la señalización involucrada en la respuesta a daño en el ADN y a las vías de reparación de ruptura de doble cadena, de recombinación homóloga y de unión de extremos no homólogos [276]. Por ello, tratamientos que causan daño a nivel de ADN como la radioterapia, inhibidores de topoisomerasa, quimioterapéuticos basados en platino, se están evaluando en combinación con inhibidores de HDAC en ensayos clínicos. Algunos de los fármacos quimioterapéuticos

citotóxicos convencionales que han sido estudiados en ensayos clínicos en combinación con inhibidores de HDAC son el carboplatino, paclitaxel, fluorouracilo y GEM [277].

La muerte celular inducida por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala también viene mediada por la inducción de daños en el ADN. Sin embargo, la combinación de TSA con CLytA-DAO únicamente demostró ser efectiva en líneas celulares de GBM (**Figura 79**).

Otra molécula involucrada en la respuesta al daño en el ADN es PARP-1, que se activa cuando se produce daño en el ADN y recluta a las proteínas de reparación en la zona donde se ha producido el daño mediante una modificación postraduccional conocida como PARilación. Los inhibidores de PARP-1 han demostrado ser útiles en el tratamiento de cáncer de mama con mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* [278]. Los productos de estos dos genes participan en la recombinación homóloga que se produce durante la reparación de daños en la doble cadena de ADN, de modo que si inhibimos también el resto de sistemas de reparación de ADN con los inhibidores de PARP1, se produce el fenómeno conocido como letalidad sintética [279]. Los inhibidores de PARP también pueden causar citotoxicidad bloqueando la replicación celular. Al inhibir la disociación de PARP del ADN, se quedan atrapados en la región en la que se ha producido el daño [280], colapsando la horquilla de replicación, causando el bloqueo y la muerte de las células.

Hasta el momento, cuatro inhibidores de PARP (olaparib, niraparib, rucaparib y talazoparib) han sido aprobados por la FDA para su uso en clínica y otro compuesto, el veliparib, ya ha obtenido resultados prometedores en fase III [280,281]. Sin embargo, los inhibidores de PARP fueron desarrollados originalmente para sensibilizar a los tumores frente a los agentes que causan daño en el ADN, incluyendo la radiación ionizante, agentes alquilantes como la TMZ e inhibidores de la topoisomerasa I como la camptotecina y el topotecan [282,283].

En las líneas celulares de CP y CCR, la inhibición de PARP indujo una disminución de la muerte celular causada por el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, puesto que la sobreactivación de PARP-1 es necesaria para que se produzca la muerte (**Figura 60**). En cambio, la inhibición de PARP-1 en las líneas celulares de GBM tuvo un efecto sinérgico con el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala, aumentando significativamente la inducción de muerte celular (**Figura 80**). Esto concuerda con los resultados del ciclo celular que

mostraban una menor fragmentación del ADN en las líneas celulares de GBM con respecto al daño observado en las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino y colorrectal (**Figura 33**).

5.7. El tratamiento con CLytA-DAO podría ser efectivo en un amplio número de pacientes de CP, CCR y GBM

Con el fin de transformar el tratamiento con CLytA-DAO en una estrategia terapéutica anticancerígena eficaz, es importante determinar si su efecto podría extenderse a un número de pacientes lo suficientemente amplio o si, por el contrario, la mayoría de los pacientes sería resistente. En el **apartado 4.3**, se ha identificado un conjunto de genes y proteínas cuya elevada expresión y/o activación radica en una mayor resistencia frente al tratamiento con CLytA-DAO/D-Ala. En este sentido, la resistencia de Hs766T se ha relacionado con P38, NF- κ B, Nrf2, OGG1, MRP1, catalasa y XBP-1 y, la resistencia de HT-29 implica, aparte de P38 y NF- κ B, la participación de GPX2.

A continuación, se inició un estudio piloto para evaluar la expresión de algunos de estos genes (*NFE2L2*, *OGG1*, *ABCC1*, *CAT* y *GPX2*) en biopsias de pacientes con CP, CCR y GBM y, los resultados se complementaron con datos de expresión génica extraídos de la base de datos UALCAN. El objetivo de utilizar UALCAN no fue comparar sus datos con los resultados de este trabajo, sino utilizar esta herramienta para ampliar la información. Los datos no son comparables puesto que los resultados del **apartado 4.5** proceden de análisis de qPCR, en los que la expresión de los genes ha sido normalizada utilizando un control interno (18S), mientras que los datos de UALCAN se obtienen de arrays y se representan como transcritos del gen por cada millón de transcritos. UALCAN se ha utilizado para obtener información acerca de si un determinado gen se encuentra expresado diferencialmente entre los diferentes tipos de tumores o con respecto al tejido no tumoral y si su expresión se ha relacionado con la supervivencia del paciente, como una muestra indirecta de que podría participar en algún mecanismo de resistencia frente a fármacos.

Si se observan únicamente los datos de expresión obtenidos en las biopsias, el porcentaje de pacientes que muestran una elevada expresión génica se indica en la **Tabla 15**. Sin embargo, al comparar la expresión de dichos genes con la obtenida en las líneas celulares resistentes (Hs766T o HT-29), la realidad es que estos porcentajes son bastante inferiores. En ese caso, únicamente un paciente de CCR y tres de GBM mostraron una expresión de *NFE2L2* superior al 50% con respecto a la observada en Hs766T y, de hecho, dos de esos pacientes de GBM mostraron una expresión superior a la que tuvo lugar en Hs766T (**Figura 82**). Con respecto al resto de genes estudiados (*OGG1*, *ABCC1*, *CAT* y *GPX2*), todos ellos mostraron una expresión muy inferior a la observada en la correspondiente línea celular resistente, estando la máxima expresión en todos los casos por debajo del 10% (**Figura 84**, **Figura 86**, **Figura 88**, **Figura 90**). Estos resultados sugieren que la expresión de estos genes no sería problemática para el uso del ClytA-DAO como tratamiento en los tumores analizados.

Origen/gen	<i>NFE2L2</i>	<i>OGG1</i>	<i>ABCC1</i>	<i>CAT</i>	<i>GPX2</i>
CP	14%	43%	30%	43%	11%
CCR	60%	20%	60%	40%	60%
GBM	50%	80%	50%	60%	0%

Tabla 15. Porcentaje de pacientes de CP, CCR y GBM con elevada expresión de los genes *NFE2L2*, *OGG1*, *ABCC1*, *CAT* y *GPX2*.

La mayor variabilidad en la expresión génica se produjo en las biopsias de GBM, concretamente en los genes *NFE2L2* (**Figura 82**), *OGG1* (**Figura 84**) y *CAT* (**Figura 88**). Por el contrario, los análisis de UALCAN indicaron que la expresión de *NFE2L2* y *OGG1* es bastante similar entre los distintos tipos de tumores (**Figura 83**, **Figura 85**), mientras que la expresión de *CAT* es más variable en CP y CC que en GBM (**Figura 89**). En el caso de *GPX2*, mientras que nuestros análisis mostraron baja variabilidad en la expresión (**Figura 90**), los resultados de UALCAN indicaron una gran dispersión de datos entre los pacientes de CP (**Figura 91**).

Al analizar la expresión del gen *NFKB1* en la base de datos UALCAN, únicamente se observó que su expresión es menor en los GBM (**Figura 81**). Sin embargo, en este trabajo se ha determinado que el factor que resulta importante en la resistencia frente al

tratamiento con CLytA-DAO no es una expresión diferencial de *NFKB1*, sino una elevada fosforilación. De hecho, está descrito que la activación aberrante de NF- κ B está implicada en el desarrollo de resistencia frente a la quimioterapia (ej. Cisplatino) [284] y a la radioterapia [285].

Con respecto al gen *NFE2L2*, el tratamiento con CLytA-DAO parece que podría ser efectivo en la mayoría de los pacientes de CP y CCR, sin embargo, la expresión observada en algunos de los pacientes de GBM sugiere una posible resistencia frente al tratamiento con CLytA-DAO. Varios estudios han demostrado una relación entre la sobreexpresión de *NFE2L2* y la resistencia frente a fármacos quimioterapéuticos en diferentes tipos de tumores, pudiendo convertirse en un marcador de mal pronóstico para los pacientes [286–289]. Concretamente en los gliomas se ha observado que la expresión de *NFE2L2* se asocia con la migración, invasión y renovación de las células madre tumorales [290,291] y su silenciamiento disminuye la proliferación celular mediante la depleción de ATP y la inhibición de la vía de mTOR [292]. Sin embargo, nuestros datos de expresión en líneas celulares de GBM parecen indicar que la sobreexpresión de *NFE2L2* no es suficiente para causar la resistencia frente a CLytA-DAO, ya que T98 presentó una expresión de *NFE2L2* superior a la observada en Hs766T (**Figura 82**) y, aunque esto parece protegerle frente al daño en el ADN (**Figura 33**), no impidió los daños en la membrana plasmática (**Figura 35, Figura 47, Figura 48**) causados por los ROS.

En el análisis realizado con UALCAN se observó que los pacientes de GBM presentan una mayor expresión que el tejido normal (**Figura 83**). Otros autores demostraron la alta expresión de *NFE2L2* en líneas celulares de gliomas con respecto al tejido cerebral no tumoral y, en ese mismo estudio, se determinó que los niveles de expresión más elevados correlacionaban con los gliomas de alto grado [293]. En conjunto, todos estos datos con *NFE2L2* en GBM indican que es necesario aumentar el número de muestras de pacientes y de cultivos primarios de GBM para poder establecer una relación entre el efecto de CLytA-DAO y la expresión de *NFE2L2*.

El gen *OGG1* está también altamente expresado en Hs766T, sin embargo, los análisis de expresión concluyeron que esto no es determinante para la resistencia frente a CLytA-DAO, ya que varias líneas celulares sensibles al efecto citotóxico mostraron altos

niveles de expresión (**Figura 84**). Los datos de UALCAN indicaron que la expresión de *OGG1* es mayor en el tejido tumoral que en el sano, sobre todo en los pacientes con CC, CR y GBM (**Figura 85**). En contraste con estos datos, un estudio previo realizado en muestras de CCR demostró que la expresión de *OGG1* era inferior en el tejido tumoral con respecto al sano y que la expresión era menor en los tumores que se encontraban en etapas más avanzadas de la enfermedad [294].

Por su parte, el gen *ABCC1* mostró la expresión más elevada en las líneas celulares de CP, seguido de las de CCR y la más baja se produjo en los GBM (**Figura 86**). Los análisis extraídos de UALCAN también indicaron una expresión menor en las muestras de GBM, en comparación con el CC, CR y el CP y, los pacientes con CC y CR mostraron una mayor expresión con respecto al tejido no tumoral (**Figura 87**). La mayor expresión de *ABCC1* con respecto al tejido no tumoral también se ha descrito en la literatura, tanto en CCR [295] como en CP [296]. Existen estudios que demuestran que la elevada expresión de *ABCC1* correlaciona con una mayor resistencia a la quimioterapia en varios tipos de tumores [297–299]. Con respecto a las biopsias de pacientes, tanto en *OGG1* (**Figura 84**) como en *ABCC1* (**Figura 86**), la expresión en todas las muestras fue muy inferior a la observada en Hs766T.

El último de los genes cuya sobreexpresión se relacionó con la resistencia de Hs766T frente al efecto citotóxico de CLyTA-DAO fue *CAT*. Todas las líneas celulares y biopsias de CP, CCR y GBM mostraron una expresión de *CAT* un 80% inferior a la observada en Hs766T (**Figura 88**). Por su parte, los datos de UALCAN demostraron que la expresión de *CAT* es inferior en el tejido tumoral con respecto al no tumoral en las muestras de CC y CR (**Figura 89**). Existen multitud de estudios tanto en líneas celulares como en biopsias que indican que la expresión de catalasa es inferior en las muestras tumorales con respecto al tejido normal en diferentes tipos de tumores [300–305].

En un trabajo previo se demostró que inducir la sobreexpresión de *CAT* no genera resistencias frente a la radioterapia o fármacos quimioterapéuticos como doxorrubicina, cisplatino o 5-FU, aunque sí frente a terapias pro-oxidantes [306]. En otro estudio se generó una línea celular resistente frente al H₂O₂ y demostró que en dicha línea celular aumentó la expresión de *CAT* con respecto a la parental [307].

Para finalizar, la principal proteína antioxidante cuya sobreexpresión está involucrada en la resistencia de HT-29 es GPX2. La expresión de *GPX2* en las biopsias de pacientes fue muy inferior a la observada en la línea celular HT-29, resistente al efecto citotóxico de CLytA-DAO (**Figura 90**). Con respecto a los GBM, no se observó expresión de *GPX2* ni en las líneas celulares derivadas de cultivos primarios ni en las biopsias (**Figura 90**). Este dato fue confirmado con los análisis de expresión de UALCAN (**Figura 91**). A su vez, la alta expresión de *GPX2* se asocia a un mal pronóstico en los pacientes de GBM [308].

Los datos recopilados en la herramienta UALCAN indican una mayor expresión de *GPX2* en el tejido tumoral de CC, y CR con respecto al correspondiente tejido sano (**Figura 91**). En este sentido, la alta expresión en CCR ha sido extensamente descrita y parece estar relacionada con el proceso de carcinogénesis [309,310]. Los pacientes de CP recopilados en UALCAN también mostraron una elevada expresión de *GPX2* (**Figura 91**). Un estudio previo determinó la elevada expresión de *GPX2* en CP y demostró que su silenciamiento podría reducir la proliferación, metástasis e invasividad, disminuyendo el desarrollo del CP [311].

En conclusión, y a la espera de aumentar el número de muestras y analizar la expresión de más genes implicados en la resistencia al tratamiento con CLytA-DAO, los datos mencionados sugieren que dicho tratamiento podría ser eficaz como terapia anticancerígena frente a un alto porcentaje de pacientes de CP, CCR y GBM.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

**Si vas a cobrarte la vida de un hombre, debes mirarlo
a los ojos y escuchar sus últimas palabras.**

JUEGO DE TRONOS.

1. El tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala disminuye la proliferación celular en todas las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino, carcinoma colorrectal y glioblastoma estudiadas. El efecto antiproliferativo es mayor en las líneas celulares de carcinoma de páncreas y carcinoma colorrectal que en las de glioblastoma. Los valores de IC₅₀ revelan a HT-29 como la línea celular menos sensible al efecto antiproliferativo inducido por CLytA-DAO.
2. La disminución de la proliferación celular observada en la mayoría de las líneas celulares utilizadas se debe a un efecto citotóxico, menos pronunciado en las líneas celulares de glioblastoma. El porcentaje de citotoxicidad en las líneas celulares Hs766T de carcinoma de páncreas y HT-29 de carcinoma colorrectal es muy inferior al observado en el resto de las líneas celulares, catalogándose como resistentes a la muerte inducida por CLytA-DAO.
3. El aumento del tiempo de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en Hs766T y HT-29 induce un incremento de la muerte celular menor que el observado en el resto de las líneas celulares, confirmando su resistencia a la muerte celular inducida por CLytA-DAO.
4. El efecto de CLytA-DAO y D-Ala sobre las líneas celulares no tumorales estudiadas, es significativamente inferior al observado en los modelos tumorales. El tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala únicamente produce un moderado efecto citotóxico en la línea celular IMR90 de fibroblastos.
5. La inmovilización de la enzima CLytA-DAO en nanopartículas magnéticas aumenta significativamente su efecto citotóxico con respecto al inducido por la enzima libre debido a un aumento de la estabilidad de la enzima a 37°C. Las nanopartículas magnéticas utilizadas no generan efectos citotóxicos por sí mismas.
6. La afinidad del dominio CLytA por la colina y sus derivados, permite una inmovilización sencilla y rápida y proporciona la opción de poder liberar la enzima mediante la adición externa de colina.
7. Se ha logrado inmovilizar CLytA-DAO en nanopartículas de oro, gracias a la afinidad de este metal por el azufre, así como en cápsulas de alginato, aunque el efecto citotóxico inducido ha sido inferior al observado con la enzima libre.

8. En las primeras horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala se genera un aumento intracelular de los radicales libres, que causa daños en el ADN y la membrana plasmática y despolariza la membrana mitocondrial, desembocando en la muerte celular. La bajada del potencial de membrana mitocondrial está mediada en la mayoría de los casos por la salida del calcio del RE y su movilización hacia las mitocondrias.
9. El tratamiento con H₂O₂ induce un efecto antiproliferativo en todas las líneas tumorales estudiadas, aunque los patrones de resistencia son diferentes a los inducidos por CLytA-DAO. Los valores de IC₅₀ muestran a HT-29, la línea celular más resistente a CLytA-DAO, como una de las líneas celulares más sensibles a H₂O₂.
10. El efecto del tratamiento puntual con H₂O₂ es principalmente citostático, causando un bloqueo del ciclo celular en la fase G₂/M, en la mayoría de las líneas celulares tumorales estudiadas, con la excepción de HGUE-GB-18 en la que sí que se produce un efecto citotóxico.
11. Las diferencias entre el efecto inducido por CLytA-DAO/D-Ala y H₂O₂ se deben a la cinética de producción de radicales libres. Mientras que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala genera radicales libres de forma lenta y continuada hasta que la enzima pierde por completo su actividad, el tratamiento con H₂O₂ causa un aumento rápido de radicales libres, seguido por un descenso.
12. La muerte celular inducida por CLytA-DAO y D-Ala es dependiente del contexto celular. En las líneas celulares de glioblastoma se produce una apoptosis intrínseca, excepto en T98 en la que se ha observado un componente necrótico. En las líneas celulares de carcinoma de páncreas exocrino y carcinoma colorrectal se produce una necrosis inducida por la transición de permeabilidad mitocondrial.
13. Existen variaciones en el tipo de necrosis en función de la participación del calcio, PARP-1 y AIF. En RWP-1 de carcinoma de páncreas exocrino, la muerte celular inducida es *parthanatos*. La muerte en IMIM-PC-2 es independiente de PARP-1 y de la movilización de calcio intracelular y, en el caso de SW-480 y SW-620 de CCR, se produce una muerte dependiente de PARP-1 y de la movilización de calcio, pero independiente de AIF.
14. No se ha observado relación entre el aumento de la fosforilación de ERK y JNK y el efecto citotóxico del tratamiento con CLytA-DAO, en cambio, la MAPK p38 parece

- desempeñar un papel crucial en la respuesta frente a la muerte celular inducida por CLytA-DAO y D-Ala.
15. Las primeras horas de tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala en Hs766T causan un aumento de los ROS y del daño en el ADN, pero no la despolarización de la membrana mitocondrial. En cambio, en HT-29 tiene lugar la despolarización de la membrana mitocondrial, siendo el aumento de los ROS y del daño en el ADN, muy inferior al observado en el resto de las líneas celulares.
 16. Existen varios factores implicados en la resistencia de la línea celular Hs766T frente al efecto citotóxico inducido por CLytA-DAO. Por un lado, la sobreexpresión de varias proteínas antioxidantes, como la catalasa y Nrf2, y con altos niveles de activación de proteínas relacionadas con la supervivencia, la respuesta al estrés y a procesos inflamatorios como NF- κ B y p38. Hs766T presenta además una alta expresión basal de otros genes relacionados con la detoxificación, como *OGG1*, y con la resistencia a fármacos, como *ABCC1*.
 17. La resistencia a la muerte celular inducida por CLytA-DAO en HT-29 viene mediada por NF- κ B, p38 y por la proteína antioxidante GPX2.
 18. Bajas dosis de CLytA-DAO inducen una mayor sensibilidad frente a tratamientos que afectan al ADN de forma directa o indirecta en algunas líneas celulares. El tratamiento con CLytA-DAO potencia el efecto de la radioterapia en RWP-1 de carcinoma de páncreas, de la carmustina en T98 de glioblastoma y del TSA y del DPQ en HGUE-GB-18, HGUE-GB-37 y HGUE-GB-39 de glioblastoma.
 19. Los análisis de expresión génica realizados en biopsias de pacientes junto con los datos extraídos de la plataforma UALCAN sugieren que el tratamiento con CLytA-DAO y D-Ala podría constituir una estrategia terapéutica efectiva en un amplio rango de pacientes de carcinoma de páncreas, carcinoma colorrectal y glioblastoma, con la excepción del gen *NFE2L2*, cuya expresión debería ser considerada sobre todo en los pacientes de glioblastoma.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

**Sólo tú puedes decidir qué hacer con el tiempo que
se te ha dado.** EL SEÑOR DE LOS ANILLOS.

1. Weinberg, R.A. The Nature of Cancer. In *The Biology of Cancer*, 2nd ed.; Garland Science, Taylor & Francis Group: New York and London, 2014; pp. 31-69
2. Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R.L.; Torre, L.A.; Jemal, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394–424. doi: 10.3322/caac.21492
3. Ferlay, J.; Ervik, M.; Lam, F.; Colombet, M.; Mery, L.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Soerjomataram, I.; Bray, F. Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. 2018. Available online: <https://gco.iarc.fr/today>.
4. Brown, K.F.; Rungay, H.; Dunlop, C.; Ryan, M.; Quartly, F.; Cox, A.; Deas, A.; Elliss-Brookes, L.; Gavin, A.; Hounsome, L.; et al. The fraction of cancer attributable to modifiable risk factors in England, Wales, Scotland, Northern Ireland, and the United Kingdom in 2015. *Br. J. Cancer.* **2018**, *118*, 1130–41. doi: 10.1038/s41416-018-0029-6
5. Wilson, L.F.; Antonsson, A.; Green, A.C.; Jordan, S.J.; Kendall, B.J.; Nagle, C.M.; Neale, R.E.; Olsen, C.M.; Webb, P.M.; Whiteman, D.C. How many cancer cases and deaths are potentially preventable? Estimates for Australia in 2013. *Int. J. Cancer.* **2018**, *142*, 691–701. doi: 10.1002/ijc.31088.
6. Islami, F.; Goding Sauer, A.; Miller, K.D.; Siegel, R.L.; Fedewa, S.A.; Jacobs, E.J.; McCullough, M.L.; Patel, A. V; Ma, J.; Soerjomataram, I.; et al. Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States. *CA. Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 31–54. doi: 10.3322/caac.21440
7. Mohammed, S.; Van Buren, G.; Fisher, W.E. Pancreatic cancer: Advances in treatment. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 9354–60. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9354.
8. Brune, K.; Abe, T.; Canto, M.; O'Malley, L.; Klein, A.P.; Maitra, A.; Volkan Adsay, N.; Fishman, E.K.; Cameron, J.L.; Yeo, C.J.; et al. Multifocal neoplastic precursor lesions associated with lobular atrophy of the pancreas in patients having a strong family history of pancreatic cancer. *Am. J. Surg. Pathol.* **2006**, *30*, 1067–76.
9. Peters, M.L.B.; Eckel, A.; Mueller, P.P.; Tramontano, A.C.; Weaver, D.T.; Lietz, A.; Hur, C.; Kong, C.Y.; Pandharipande, P.V. Progression to pancreatic ductal adenocarcinoma from pancreatic intraepithelial neoplasia: Results of a simulation model. *Pancreatology.* **2018**, *18*, 928–34. doi: 10.1016/j.pan.2018.07.009.
10. Tanaka, M.; Chari, S.; Adsay, V.; Fernandez-del Castillo, C.; Falconi, M.; Shimizu, M.; Yamaguchi, K.; Yamao, K.; Matsuno, S. International consensus guidelines for management of intraductal papillary mucinous neoplasms and mucinous cystic neoplasms of the pancreas. *Pancreatology.* **2006**, *6*, 17-32. doi: 10.1159/000090023
11. Bosman, F.T., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D. WHO Classification of Tumours of the Digestive System. In *WHO Classification of Tumours of the Digestive System*, 4th ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2010, Volume 3.
12. Collisson, E.A.; Bailey, P.; Chang, D.K.; Biankin, A.V. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 207–20. doi: 10.1038/s41575-019-0109-y.
13. Moffitt, R.A.; Marayati, R.; Flate, E.L.; Volmar, K.E.; Loeza, S.G.H.; Hoadley, K.A.; Rashid, N.U.; Williams, L.A.; Eaton, S.C.; Chung, A.H.; et al. Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat. Genet.* **2015**, *47*, 1168–78. doi: 10.1038/ng.3398.

Bibliografia

14. Bailey, P.; Chang, D.K.; Nones, K.; Johns, A.L.; Patch, A.M.; Gingras, M.C.; Miller, D.K.; Christ, A.N.; Bruxner, T.J.C.; Quinn, M.C.; et al. Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*. **2016**, *531*, 47–52. doi: 10.1038/nature16965.
15. Varadhachary, G.R.; Tamm, E.P.; Abbruzzese, J.L.; Xiong, H.Q.; Crane, C.H.; Wang, H.; Lee, J.E.; Pisters, P.W.T.; Evans, D.B.; Wolff, R.A. Borderline resectable pancreatic cancer: Definitions, management, and role of preoperative therapy. *Ann. Surg. Oncol.* **2006**, *13*, 1035–46. doi: 10.1245/ASO.2006.08.011.
16. Compton, C.C.; Byrd, D.R.; Garcia-Aguilar, J.; Kurtzman, S.H.; Olawaiye, A.; Washington, M.K. Exocrine and Endocrine Pancreas. In *AJCC Cancer Staging Atlas*, 2nd. ed.; Springer: New York, 2012; pp. 297–308.
17. Howlader, N.; Noone, A.M.; Krapcho, M.; Miller, D.; Brest, A.; Yu, M.; Ruhl, J.; Tatalovich, Z.; Mariotto, A.; Lewis, D.R.; et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. Bethesda, M.D., http://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER website, April 2019.
18. Rawla, P.; Sunkara, T.; Gaduputi, V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World J. Oncol.* **2019**, *10*, 10–27. doi: 10.14740/wjon1166
19. Midha, S.; Chawla, S.; Garg, P.K. Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Lett.* **2016**, *381*, 269–77. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.022.
20. Vincent, A.; Herman, J.; Schulick, R.; Hruban, R.H.; Goggins, M. Pancreatic cancer. *Lancet.* **2011**, *378*, 607–20. doi: 10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
21. Chari, S.T.; Leibson, C.L.; Rabe, K.G.; Timmons, L.J.; Ransom, J.; de Andrade, M.; Petersen, G.M. Pancreatic Cancer-Associated Diabetes Mellitus: Prevalence and Temporal Association With Diagnosis of Cancer. *Gastroenterology*. **2008**, *134*, 95–101. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.040.
22. Tempero, M.A.; Malafa, M.P.; Al-Hawary, M.; Asbun, H.; Bain, A.; Behrman, S.W.; Al Benson, B.; Binder, E.; Cardin, D.B.; Cha, C.; et al. Pancreatic adenocarcinoma, version 2.2017, NCCN Clinical practice guidelines in Oncology. *J. Natl. Compr. Cancer Netw.* **2017**, *15*, 1028–61. doi: 10.6004/jnccn.2017.0131.
23. Ballehaninna, U.K.; Chamberlain, R.S. The clinical utility of serum CA 19-9 in the diagnosis, prognosis and management of pancreatic adenocarcinoma: An evidence based appraisal. *J. Gastrointest. Oncol.* **2012**, *3*, 105–19. doi: 10.3978/j.issn.2078-6891.2011.021.
24. Conroy, T.; Hammel, P.; Hebbar, M.; Ben Abdelghani, M.; Wei, A.C.; Raoul, J.L.; Choné, L.; Francois, E.; Artru, P.; Biagi, J.J.; et al. FOLFIRINOX or gemcitabine as adjuvant therapy for pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**; *379*, 2395–406. doi: 10.1056/NEJMoa1809775.
25. Wayne, J.D.; Abdalla, E.K.; Wolff, R.A.; Crane, C.H.; Pisters, P.W.T.; Evans, D.B. Localized Adenocarcinoma of the Pancreas: The Rationale for Preoperative Chemoradiation. *Oncologist*. **2002**, *7*, 34–45. doi: 10.1634/theoncologist.7-1-34.
26. Moore, M.J.; Goldstein, D.; Hamm, J.; Figer, A.; Hecht, J.R.; Gallinger, S.; Au, H.J.; Murawa, P.; Walde, D.; Wolff, R.A.; et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 1960–6. doi: 10.1200/JCO.2006.07.9525.
27. Pu, N.; Lou, W.; Yu, J. PD-1 immunotherapy in pancreatic cancer. *J. Pancreatol.* **2019**, *2*, 6–10. doi: 10.1097/JP9.000000000000010.

28. Payá, A.; Niveiro, M. Pólipos y poliposis colónica. *GH Contin.* **2001**, *1*, 1–5.
29. Stewart, S.L.; Wike, J.M.; Kato, I.; Lewis, D.R.; Michaud, F. A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998–2001. *Cancer.* **2006**, *107*, 1128–41. doi: 10.1002/cncr.22010.
30. Ponz De Leon, M.; Di Gregorio, C. Pathology of colorectal cancer. *Dig. Liver Dis.* **2001**, *33*, 372–88. doi: 10.1016/s1590-8658(01)80095-5.
31. Fearon, E.R.; Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* **1990**, *61*, 759–67. doi: 10.1016/0092-8674(90)90186-i.
32. Nguyen, H.T.; Duong, H.Q. The molecular characteristics of colorectal cancer: Implications for diagnosis and therapy (review). *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 9–18. doi: 10.3892/ol.2018.8679.
33. Sobin, L.H., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C. TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed.; John Wiley & Sons: Oxford, UK, 2009.
34. Arnold, M.; Sierra, M.S.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut.* **2017**, *66*, 683–91. doi: 10.1136/gutjnl-2015-310912.
35. Rawla, P.; Sunkara, T.; Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterology Rev.* **2019**, *14*, 89-103. doi: 10.5114/pg.2018.81072.
36. International Agency for Research on Cancer. Colorectal Cancer Screening. In *IARC handbooks of cancer prevention.* **2019**, *17*, 14–21.
37. Fijten, G.H.; Starmans, R.; Muris, J.W.M.; Schouten, H.J.A.; Blijham, G.H.; Knottnerus, J.A. Predictive value of signs and symptoms for colorectal cancer in patients with rectal bleeding in general practice. *Fam. Pract.* **1995**, *12*, 279–86. doi: 10.1093/fampra/12.3.279.
38. Labianca, R.; Nordlinger, B.; Beretta, G.D.; Mosconi, S.; Mandalà, M.; Cervantes, A.; Arnold, D. Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2013**, *24*, 64-72. doi: 10.1093/annonc/mdt354.
39. Böckelman, C.; Engelmann, B.E.; Kaprio, T.; Hansen, T.F.; Glimelius, B. Risk of recurrence in patients with colon cancer stage II and III: A systematic review and meta-analysis of recent literature. *Acta Oncol.* **2015**, *54*, 5–16. doi: 10.3109/0284186X.2014.975839.
40. Hewett, P.J.; Allardyce, R.A.; Bagshaw, P.F.; Frampton, C.M.; Frizelle, F.A.; Rieger, N.A.; Smith, J.S.; Solomon, M.J.; Stephens, J.H.; Stevenson, A.R.L. Short-term outcomes of the australasian randomized clinical study comparing laparoscopic and conventional open surgical treatments for colon cancer: The ALCCaS trial. *Ann. Surg.* **2008**, *248*, 728–38. doi: 10.1097/SLA.0b013e31818b7595.
41. Dekker, E.; Tanis, P.J.; Vleugels, J.L.A.; Kasi, P.M.; Wallace, M.B. Colorectal cancer. *Lancet.* **2019**, *394*, 1467–80. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
42. Louis, D.N.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Cavenee, W.K. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed.; World Health Organization: Lyon, France, 2007.
43. Verhaak, R.G.W.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. An Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. *Cancer Cell.* **2010**, *17*, 98–110. doi: 10.1016/j.ccr.2009.12.020.

44. Hartmann, C.; Hentschel, B.; Simon, M.; Westphal, M.; Schackert, G.; Tonn, J.C.; Loeffler, M.; Reifenberger, G.; Pietsch, T.; Von Deimling, A.; et al. Long-term survival in primary glioblastoma with versus without isocitrate dehydrogenase mutations. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 5146–57. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0017.
45. Hegi, M.E.; Liu, L.; Herman, J.G.; Stupp, R.; Wick, W.; Weller, M.; Mehta, M.P.; Gilbert, M.R. Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4189–99. doi: 10.1200/JCO.2007.11.5964.
46. Wick, W.; Platten, M.; Meisner, C.; Felsberg, J.; Tabatabai, G.; Simon, M.; Nikkhah, G.; Papsdorf, K.; Steinbach, J.P.; Sabel, M.; et al. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The NOA-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 707–15. doi: 10.1016/S1470-2045(12)70164-X.
47. Jenkins, R.B.; Blair, H.; Ballman, K. V.; Giannini, C.; Arusell, R.M.; Law, M.; Flynn, H.; Passe, S.; Felten, S.; Brown, P.D.; et al. A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 9852–61. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1796.
48. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; Von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Webster, I.; Cavenee, K.; Ohgaki, H.; Ohtoh, T.; Wiestler, D.; et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, *131*, 803–20. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
49. McNeill, K.A. Epidemiology of Brain Tumors. *Neurol. Clin.* **2016**, *34*, 981–98. doi: 10.1016/j.ncl.2016.06.014.
50. Patel, A.P.; Fisher, J.L.; Nichols, E.; Abd-Allah, F.; Abdela, J.; Abdelalim, A.; Abraha, H.N.; Agius, D.; Alahdab, F.; Alam, T.; et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* **2019**, *18*, 376–93. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30468-X.
51. Ostrom, Q.T.; Gittleman, H.; Liao, P.; Vecchione-Koval, T.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J.S. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro. Oncol.* **2017**, *19*, 1–88. doi: 10.1093/neuonc/nox158.
52. Butowski, N.A. Epidemiology and diagnosis of brain tumors. *Continuum (Minneapolis)*. **2015**, *21*, 301–13. doi: 10.1212/01.CON.0000464171.50638.f8.
53. Lapointe, S.; Perry, A.; Butowski, N.A. Primary brain tumours in adults. *Lancet.* **2018**, *392*, 432–46. doi: 10.1016/S0140-6736(18)30990-5.
54. Wesseling, P.; Capper, D. WHO 2016 Classification of gliomas. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **2018**, *44*, 139–50. doi: 10.1111/nan.12432.
55. Forsyth, P.A.; Shaw, E.G.; Scheithauer, B.W.; O’Fallon, J.R.; Layton, D.D. Jr.; Katzmann, J.A. Supratentorial pilocytic astrocytomas. A clinicopathologic, prognostic, and flow cytometric study of 51 patients. *Cancer.* **1993**, *72*, 1335–42. doi: 10.1002/1097-0142(19930815)72:4<1335::aid-cnrcr2820720431>3.0.co;2-e.
56. Jakola, A.S.; Skjulsvik, A.J.; Myrnes, K.S.; Sjøvik, K.; Unsgård, G.; Torp, S.H.; Aaberg, K.; Berg, T.; Dai, H.Y.; Johnsen, K.; et al. Surgical resection versus watchful waiting in low-grade gliomas. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 1942–48. doi: 10.1093/annonc/mdx230.
57. Pignatti, F.; Van den Bent, M.; Curran, D.; Debruyne, C.; Sylvester, R.; Therasse, P.; Áfra, D.;

- Cornu, P.; Bolla, M.; Vecht, C.; et al. Prognostic factors for survival in adult patients with cerebral low-grade glioma. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 2076–84. doi: 10.1200/JCO.2002.08.121.
58. Van Den Bent, M.J.; Afra, D.; De Witte, O.; Ben Hassel, M.; Schraub, S.; Hoang-Xuan, K.; Malmström, P.O.; Collette, L.; Piérart, M.; Mirimanoff, R.; et al. Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults: The EORTC 22845 randomised trial. *Lancet.* **2005**, *366*, 985–90. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67070-5.
59. Buckner, J.C.; Shaw, E.G.; Pugh, S.L.; Chakravarti, A.; Gilbert, M.R.; Barger, G.R.; Coons, S.; Ricci, P.; Bullard, D.; Brown, P.D.; et al. Radiation plus Procarbazine, CCNU, and Vincristine in Low-Grade Glioma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 1344–55. doi: 10.1056/NEJMoa1500925.
60. Weller, M.; van den Bent, M.; Tonn, J.C.; Stupp, R.; Preusser, M.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Henriksson, R.; Rhun, E. Le; Balana, C.; Chinot, O.; et al. European Association for Neuro-Oncology (EANO) guideline on the diagnosis and treatment of adult astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Lancet Oncol.* **2017**, *18*, e315–e329. doi: 10.1016/S1470-2045(17)30194-8.
61. Wick, W.; Roth, P.; Hartmann, C.; Hau, P.; Nakamura, M.; Stockhammer, F.; Sabel, M.C.; Wick, A.; Koeppen, S.; Ketter, R.; et al. Long-term analysis of the NOA-04 randomized phase III trial of sequential radiochemotherapy of anaplastic glioma with PCV or temozolomide. *Neuro. Oncol.* **2016**, *18*, 1529–37. doi: 10.1093/neuonc/nov133.
62. Stupp, R.; Mason, W.P.; Van Den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.B.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352*, 987–96. doi: 10.1056/NEJMoa043330.
63. Perry, J.R.; Laperriere, N.; O’Callaghan, C.J.; Brandes, A.A.; Menten, J.; Phillips, C.; Fay, M.; Nishikawa, R.; Cairncross, J.G.; Roa, W.; et al. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1027–37. doi: 10.1056/NEJMoa1611977.
64. Pajtler, K.W.; Mack, S.C.; Ramaswamy, V.; Smith, C.A.; Witt, H.; Smith, A.; Hansford, J.R.; von Hoff, K.; Wright, K.D.; Hwang, E.; et al. The current consensus on the clinical management of intracranial ependymoma and its distinct molecular variants. *Acta Neuropathol.* **2017**, *133*, 5–12. doi: 10.1007/s00401-016-1643-0.
65. Mohile, N.A. Medical Complications of Brain Tumors. *Continuum (Minneapolis, Minn.)* **2017**, *23*, 1635–52. doi: 10.1212/CON.0000000000000540.
66. Alshehri, N.; Cote, D.J.; Hulou, M.M.; Alghamdi, A.; Alshahrani, A.; Mekary, R.A.; Smith, T.R. Venous thromboembolism prophylaxis in brain tumor patients undergoing craniotomy: a meta-analysis. *J. Neurooncol.* **2016**, *130*, 561–70. doi: 10.1007/s11060-016-2259-x.
67. Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience.* **2019**, *13*, 961. doi: 10.3332/ecancer.2019.961.
68. Greco, O.; Dachs, G.U. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: Historical appraisal and future prospectives. *J. Cell. Physiol.* **2001**, *187*, 22–36. doi: 10.1002/1097-4652(2001)9999:9999::AID-JCP1060>3.0.CO;2-H.
69. Dorer, D.E.; Nettelbeck, D.M. Targeting cancer by transcriptional control in cancer gene therapy and viral oncolysis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2009**, *61*, 554–71. doi:

- 10.1016/j.addr.2009.03.013.
70. Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C.J. Introduction to the Background, Principles, and State of the Art in Suicide Gene Therapy. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 71–88. doi: 10.1385/MB:30:1:071.
 71. Karjoo, Z.; Chen, X.; Hatefi, A. Progress and Problems with the Use of Suicide Genes for Targeted Cancer Therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 113–28. doi: 10.1016/j.addr.2015.05.009.
 72. Morton, J.G.; Day, E.S.; Halas, N.J.; West, J.L. Nanoshells for photothermal cancer therapy. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *624*, 101–17. doi: 10.1007/978-1-60761-609-2_7.
 73. Bharti, C.; Gulati, N.; Nagaich, U.; Pal, A. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review. *Int. J. Pharm. Investig.* **2015**, *5*, 124–33. doi: 10.4103/2230-973X.160844.
 74. Cordeiro, M.; Carlos, F.F.; Pedrosa, P.; Lopez, A.; Baptista, P.V. Gold nanoparticles for diagnostics: Advances towards points of care. *Diagnostics (Basel)*. **2016**, *6*, 43. doi: 10.3390/diagnostics6040043.
 75. Brown, S.D.; Nativo, P.; Smith, J.A.; Stirling, D.; Edwards, P.R.; Venugopal, B.; Flint, D.J.; Plumb, J.A.; Graham, D.; Wheate, N.J. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4678–84. doi: 10.1021/ja908117a.
 76. Tam, J.M.; Tam, J.O.; Murthy, A.; Ingram, D.R.; Ma, L.L.; Travis, K.; Johnston, K.P.; Sokolov, K.V. Controlled assembly of biodegradable plasmonic nanoclusters for near-infrared imaging and therapeutic applications. *ACS Nano*. **2010**, *4*, 2178–84. doi: 10.1021/nn9015746.
 77. Stuchinskaya, T.; Moreno, M.; Cook, M.J.; Edwards, D.R.; Russell, D.A. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 822–31. doi: 10.1039/c1pp05014a.
 78. Smith, A.M.; Nie, S.; Author, N.B. Next-generation quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **2009**, *27*, 732–33. doi: 10.1038/nbt0809-732
 79. Matea, C.T.; Mocan, T.; Tabaran, F.; Pop, T.; Mosteanu, O.; Puia, C.; Iancu, C.; Mocan, L. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. *Int. J. Nanomedicine*. **2017**, *12*, 5421–31. doi: 10.2147/IJN.S138624.
 80. Hervault, A.; Thanh, N.T.K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. *Nanoscale*. **2014**, *6*, 11553–73. doi: 10.1039/c4nr03482a.
 81. Sanchez, C.; Belleville, P.; Popall, M.; Nicole, L. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: From laboratory to market. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 696–753. doi: 10.1039/c0cs00136h.
 82. Das, J.; Choi, Y.J.; Han, J.W.; Reza, A.M.M.T.; Kim, J.H. Nanoceria-mediated delivery of doxorubicin enhances the anti-tumour efficiency in ovarian cancer cells via apoptosis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9513. doi: 10.1038/s41598-017-09876-w.
 83. Immordino, M.L.; Dosio, F.; Cattel, L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int. J. Nanomedicine*. **2006**, *1*, 297–315.

84. Martinelli, C.; Pucci, C.; Ciofani, G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioeng.* **2019**, *3*, 011502. doi: 10.1063/1.5079943.
85. Leo, C.P.; Hentschel, B.; Szucs, T.D.; Leo, C. FDA and EMA approvals of new breast cancer drugs—a comparative regulatory analysis. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 437. doi: 10.3390/cancers12020437.
86. Zhang, X.; Zhang, P. Polymersomes in Nanomedicine - A Review. *Curr. Nanosci.* **2016**, *13*, 124–9. doi: 10.2174/1573413712666161018144519.
87. Le Meins, J.-F.; Sandre, O.; Lecommandoux, S. Recent trends in the tuning of polymersomes' membrane properties. *Eur. Phys. J. E. Soft Matter*. **2011**, *34*, 14. doi: 10.1140/epje/i2011-11014-y.
88. Hanafy, N.A.N.; El-Kemary, M.; Leporatti, S. Micelles structure development as a strategy to improve smart cancer therapy. *Cancers (Basel)*. **2018**, *10*, 238. doi: 10.3390/cancers10070238.
89. De Souza, C.; Ma, Z.; Lindstrom, A.R.; Chatterji, B.P. Nanomaterials as potential transporters of HDAC inhibitors. *Med. Drug Discov.* **2020**, *6*, 100040. doi: 10.1016/j.medidd.2020.100040
90. Rai, R.; Alwani, S.; Badea, I. Polymeric nanoparticles in gene therapy: New avenues of design and optimization for delivery applications. *Polymers (Basel)*. **2019**, *11*, 745. doi: 10.3390/polym11040745.
91. Bobo, D.; Robinson, K.J.; Islam, J.; Thurecht, K.J.; Corrie, S.R. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. *Pharm. Res.* **2016**, *33*, 2373–87. doi: 10.1007/s11095-016-1958-5.
92. Gao, W.; Zhang, Y.; Zhang, Q.; Zhang, L. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery. *Ann. Biomed. Eng.* **2016**, *44*, 2049–61. doi: 10.1007/s10439-016-1583-9.
93. Houshmand, M.; Garello, F.; Circosta, P.; Stefania, R.; Aime, S.; Saglio, G.; Giachino, C. Nanocarriers as magic bullets in the treatment of leukemia. *Nanomaterials*. **2020**, *10*, 276. doi: 10.3390/nano10020276.
94. Kesharwani, P.; Jain, K.; Jain, N.K. Dendrimer as nanocarrier for drug delivery. *Prog. Polym. Sci.* **2014**, *39*, 268–307. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.07.005
95. Gillies, E.R.; Fréchet, J.M.J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today*. **2005**, *10*, 35–43. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03276-3.
96. Buocikova, V.; Rios-Mondragon, I.; Pilalis, E.; Chatziioannou, A.; Miklikova, S.; Mego, M.; Pajuste, K.; Rucins, M.; Yamani, N. El; Longhin, E.M.; et al. Epigenetics in breast cancer therapy—New strategies and future nanomedicine perspectives. *Cancers (Basel)*. **2020**, *12*, 3622. doi: 10.3390/cancers12123622.
97. Waghmare, A.S.; Grampurohit, N.D.; Gadhave, M. V; Gaikwad, D.D.; Jadhav, S.L. Solid Lipid Nanoparticles: a Promising Drug Delivery System. **2012**, *3*, 100–7.
98. Anselmo, A.C.; Mitragotri, S. Nanoparticles in the clinic: An update. *Bioeng. Transl. Med.* **2019**, *4*, e10143. doi: 10.1002/btm2.10143.
99. Sosa, V.; Moliné, T.; Somoza, R.; Paciucci, R.; Kondoh, H.; LLeonart, M.E. Oxidative stress and cancer: An overview. *Ageing Res. Rev.* **2013**, *12*, 376–90. doi: 10.1016/j.arr.2012.10.004.

Bibliografia

100. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 5th ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2015.
101. Gupta, R.K.; Patel, A.K.; Shah, N.; Chaudhary, A.K.; Jha, U.K.; Yadav, U.C.; Gupta, P.K.; Pakuwal, U. Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **2014**, *15*, 4405–9. doi: 10.7314/apjcp.2014.15.11.4405.
102. Liu, J.; Wang, Z. Increased oxidative stress as a selective anticancer therapy. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, *2015*, 294303. doi: 10.1155/2015/294303.
103. Viñas, G.; Puig, T.; Porta, R. Oxidative stress in patients with cancer: Two sides of the same coin. *Med. Clin. (Barc.)* **2012**, *139*, 171–5. doi: 10.1016/j.medcli.2011.11.021.
104. El Sayed, S.M.; Mahmoud, A.A.; El Sawy, S.A.; Abdelaal, E.A.; Fouad, A.M.; Yousif, R.S.; Hashim, M.S.; Hemdan, S.B.; Kadry, Z.M.; Abdelmoaty, M.A.; et al. Warburg effect increases steady-state ROS condition in cancer cells through decreasing their antioxidant capacities (Anticancer effects of 3-bromopyruvate through antagonizing Warburg effect). *Med. Hypotheses.* **2013**, *81*, 866–70. doi: 10.1016/j.mehy.2013.08.024.
105. Cairns, R.A.; Harris, I.S.; Mak, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.* **2011**, *11*, 85–95. doi: 10.1038/nrc2981.
106. Kovacic, P.; Jacintho, J. Mechanisms of Carcinogenesis Focus on Oxidative Stress and Electron Transfer. *Curr. Med. Chem.* **2001**, *8*, 773–96. doi: 10.2174/0929867013373084.
107. Chandel, N.S.; Tuveson, D.A. The promise and perils of antioxidants for cancer patients. *N. Engl. J. Med.* **2014**, *371*, 177–8. doi: 10.1056/NEJMcibr1405701.
108. Block, K.I.; Koch, A.C.; Mead, M.N.; Tothy, P.K.; Newman, R.A.; Gyllenhaal, C. Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic toxicity: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials. *Int. J. Cancer.* **2008**, *123*, 1227–39. doi: 10.1002/ijc.23754.
109. Reczek, C.R.; Chandel, N.S. The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 79–98. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-041916-065808.
110. Ohide, H.; Miyoshi, Y.; Maruyama, R.; Hamase, K.; Konno, R. D-Amino acid metabolism in mammals: Biosynthesis, degradation and analytical aspects of the metabolic study. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2011**, *879*, 3162–8. doi: 10.1016/j.jchromb.2011.06.028.
111. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M.S.; Molla, G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: from yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1373–94. doi: 10.1007/s00018-007-6558-4.
112. Pollegioni, L.; Falbo, A.; Pilone, M.S. Specificity and kinetics of *Rhodotorula gracilis* d-amino acid oxidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1120*, 11–6. doi: 10.1016/0167-4838(92)90418-d.
113. Pilone, M.S. Enzymes, D-Amino Acid Oxidases. In *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*; Flickinger, M.C., Ed.; John Wiley & Sons, 2010. doi: 10.1002/9780470054581.eib286
114. Turner, N.J. Deracemisation methods. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 115–21. doi: 10.1016/j.cbpa.2009.11.027.
115. Pollegioni, L.; Molla, G. New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 276–83. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.01.010.

Bibliografia

116. Weimar, W.R.; Neims, A.H. Hog cerebellar D-amino acid oxidase and its histochemical and immunofluorescent localization. *J. Neurochem.* **1977**, *28*, 559–72. doi: 10.1111/j.1471-4159.1977.tb10427.x.
117. Kaltenbach, J.P.; Ganote, C.E.; Carone, F.A. Renal tubular necrosis induced by compounds structurally related to d-serine. *Exp. Mol. Pathol.* **1979**, *30*, 209–14. doi: 10.1016/0014-4800(79)90054-6.
118. Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Pilone, M.S.; Ross, B.D. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 185–93. doi: 10.1089/hum.1998.9.2-185.
119. Nathan, C.F.; Cohn, Z.A. Antitumor effects of hydrogen peroxide in vivo. *J. Exp. Med.* **1981**, *154*, 1539–53. doi: 10.1084/jem.154.5.1539.
120. Samoszuk, M.K.; Wimley, W.C.; Nguyen, V. Eradication of Interleukin 5-transfected J558L Plasmacytomas in Mice by Hydrogen Peroxide-generating Stealth Liposomes. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 87–90.
121. Ben-Yoseph, O.; Boxer, P.A.; Ross, B.D. Oxidative stress in the central nervous system: Monitoring the metabolic response using the pentose phosphate pathway. *Dev. Neurosci.* **1994**, *16*, 328–36. doi: 10.1159/000112127.
122. Bonini, M.G.; Miyamoto, S.; Mascio, P. Di; Augusto, O. Production of the Carbonate Radical Anion during Xanthine Oxidase Turnover in the Presence of Bicarbonate. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51836–43. doi: 10.1074/jbc.M406929200.
123. Li, J.; Shen, Y.; Liu, A.; Wang, X.; Zhao, C. Transfection of the DAAO gene and subsequent induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in 9L cells. *Oncol. Rep.* **2008**, *20*, 341–6.
124. El Sayed, S.M.; Abou El-Magd, R.M.; Shishido, Y.; Chung, S.P.; Sakai, T.; Watanabe, H.; Kagami, S.; Fukui, K. D-amino acid oxidase gene therapy sensitizes glioma cells to the antiglycolytic effect of 3-bromopyruvate. *Cancer Gene Ther.* **2012**, *19*, 1–18. doi: 10.1038/cgt.2011.59.
125. Fang, J.; Deng, D.; Nakamura, H.; Akuta, T.; Qin, H.; Iyer, A.K.; Greish, K.; Maeda, H. Oxystress inducing antitumor therapeutics via tumor-targeted delivery of PEG-conjugated D-amino acid oxidase. *Int. J. Cancer.* **2008**, *122*, 1135–44. doi: 10.1002/ijc.22982.
126. Fang, J.; Sawa, T.; Akaike, T.; Maeda, H. Tumor-targeted delivery of polyethylene glycol-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3138–43.
127. Rosini, E.; Pollegioni, L.; Ghisla, S.; Orru, R.; Molla, G. Optimization of d-amino acid oxidase for low substrate concentrations - towards a cancer enzyme therapy. *FEBS J.* **2009**, *276*, 4921–32. doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07191.x.
128. Bava, A.; Gornati, R.; Cappellini, F.; Caldinelli, L.; Pollegioni, L.; Bernardini, G. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: a potential novel approach for cancer enzymatic therapy. *Nanomedicine (Lond).* **2013**, *8*, 1797–806. doi: 10.2217/nnm.12.187.
129. Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.

130. Orrenius, S.; Zhivotovsky, B.; Nicotera, P. Regulation of cell death: The calcium-apoptosis link. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 552–65. doi: 10.1038/nrm1150.
131. D’Arcy, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 582–92. doi: 10.1002/cbin.11137.
132. Tang, D.; Kang, R.; Berghe, T. Vanden; Vandenabeele, P.; Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* **2019**, *29*, 347–64. doi: 10.1038/s41422-019-0164-5.
133. Mou, Y.; Wang, J.; Wu, J.; He, D.; Zhang, C.; Duan, C.; Li, B. Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12*, 34. doi: 10.1186/s13045-019-0720-y.
134. Izzo, V.; Bravo-San Pedro, J.M.; Sica, V.; Kroemer, G.; Galluzzi, L. Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties. *Trends Cell Biol.* **2016**, *26*, 655–67. doi: 10.1016/j.tcb.2016.04.006.
135. Fatokun, A.A.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2000–16. doi: 10.1111/bph.12416.
136. Zhou, Y.; Liu, L.; Tao, S.; Yao, Y.; Wang, Y.; Wei, Q.; Shao, A.; Deng, Y. Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer. *Pharmacol. Res.* **2021**, *163*, 105299. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105299.
137. Scaturro, P.; Pichlmair, A. Oxeiptosis- A cell death pathway to mitigate damage caused by radicals. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 1191–3. doi: 10.1038/s41418-018-0134-3.
138. Santarpia, L.L.; Lippman, S.; El-Naggar, A. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets.* **2012**, *16*, 103–19. doi: 10.1517/14728222.2011.645805.
139. Son, Y.; Cheong, Y.-K.; Kim, N.-H.; Chung, H.-T.; Kang, D.G.; Pae, H.-O. Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J. Signal Transduct.* **2011**, *2011*, 792639. doi: 10.1155/2011/792639.
140. Cuadrado, A.; Nebreda, A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 403–17. doi: 10.1042/BJ20100323.
141. Ruffels, J.; Griffin, M.; Dickenson, J.M. Activation of ERK1/2, JNK and PKB by hydrogen peroxide in human SH-SY5Y neuroblastoma cells: Role of ERK1/2 in H₂O₂-induced cell death. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *483*, 163–73. doi: 10.1016/j.ejphar.2003.10.032.
142. McCubrey, J.A.; LaHair, M.M.; Franklin, R.A. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxidants Redox Signal.* **2006**, *8*, 1775–89. doi: 10.1089/ars.2006.8.1775.
143. Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The different mechanisms of cancer drug resistance: A brief review. *Adv. Pharm. Bull.* **2017**, *7*, 339–48. doi: 10.15171/apb.2017.041.
144. Burrell, R.A.; Swanton, C. Tumour heterogeneity and the evolution of polyclonal drug resistance. *Mol. Oncol.* **2014**, *8*, 1095–111. doi: 10.1016/j.molonc.2014.06.005.
145. Wang, X.; Zhang, H.; Chen, X. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resist.* **2019**, *2*, 141–60. doi: 10.20517/cdr.2019.10.
146. Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat. Rev. Cancer.* **2005**,

- 5, 275–84. doi: 10.1038/nrc1590.
147. Sauna, Z.E.; Kim, I.W.; Ambudkar, S.V. Genomics and the mechanism of P-glycoprotein (ABCB1). *J. Bioenerg. Biomembr.* **2007**, *39*, 481–7. doi: 10.1007/s10863-007-9115-9.
148. Lin, L.; Yee, S.W.; Kim, R.B.; Giacomini, K.M. SLC transporters as therapeutic targets: Emerging opportunities. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 543–60. doi: 10.1038/nrd4626.
149. Zahreddine, H.; Borden, K.L.B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer. *Front. Pharmacol.* **2013**, *4*, 28. doi: 10.3389/fphar.2013.00028.
150. Townsend, D.M.; Tew, K.D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene.* **2003**, *22*, 7369–75. doi: 10.1038/sj.onc.1206940.
151. Ma, C.; Wei, S.; Song, Y. T790M and acquired resistance of EGFR TKI: A literature review of clinical reports. *J. Thorac. Dis.* **2011**, *3*, 10–8. doi: 10.3978/j.issn.2072-1439.2010.12.02.
152. Helleday, T.; Petermann, E.; Lundin, C.; Hodgson, B.; Sharma, R.A. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2008**, *8*, 193–204. doi: 10.1038/nrc2342.
153. Roberson, R.S.; Kussick, S.J.; Vallieres, E.; Chen, S.Y.J.; Wu, D.Y. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 2795–803. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1270.
154. Grasso, S.; Martínez-Lacaci, I.; Barberá, V.M.; Castillejo, A.; Soto, J.L.; Gallego-Plazas, J.; López-Riquelme, N.; García-Morales, P.; Mata-Balaguer, T.; Ferragut, J.A.; et al. HGUE-C-1 is an atypical and novel colon carcinoma cell line. *BMC Cancer.* **2015**, *15*, 240. doi: 10.1186/s12885-015-1183-3.
155. Ventero, M.P.; Fuentes-Baile, M.; Quereda, C.; Perez-Valeciano, E.; Alenda, C.; Garcia-Morales, P.; Esposito, D.; Dorado, P.; Manuel Barbera, V.; Saceda, M. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS One.* **2019**, *14*, e0212581. doi: 10.1371/journal.pone.0212581.
156. Moldes Tabarés, C. Desarrollo de nuevos sistemas para la producción de proteínas de fusión por fermentación. Universidad Complutense de Madrid, 2003.
157. Al-Malky, H.S.; Osman, A.M.M.; Damanhour, Z.A.; Alkreathy, H.M.; Al Aama, J.Y.; Ramadan, W.S.; Al Qahtani, A.A.; Al Mahdi, H.B. Modulation of doxorubicin-induced expression of the multidrug resistance gene in breast cancer cells by diltiazem and protection against cardiotoxicity in experimental animals. *Cancer Cell Int.* **2019**, *19*, 191. doi: 10.1186/s12935-019-0912-0.
158. Yoon, D.; Lee, M.-H.; Cha, D. Measurement of Intracellular ROS in *Caenorhabditis elegans* Using 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate. *Bio Protoc.* **2018**, *8*, e2774. doi: 10.21769/BioProtoc.2774.
159. Petrova, N.S.; Zenkova, M.A.; Chernolovskaya, E.L. Structure - Functions Relations in Small Interfering RNAs. In *Practical Applications in Biomedical Engineering*; IntechOpen, 2013. doi: 10.5772/53945
160. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2277-93. doi: 10.1089/ars.2007.1782.
161. Saha, R.N.; Jana, M.; Pahan, K. MAPK p38 Regulates Transcriptional Activity of NF- κ B in Primary Human Astrocytes via Acetylation of p65. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 7101–9. doi: 10.4049/jimmunol.179.10.7101.

162. Singh, B.; Chatterjee, A.; Ronghe, A.M.; Bhat, N.K.; Bhat, H.K. Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer*. **2013**, *13*, 253. doi: 10.1186/1471-2407-13-253.
163. Ji, L.; Li, H.; Gao, P.; Shang, G.; Zhang, D.D.; Zhang, N.; Jiang, T. Nrf2 Pathway Regulates Multidrug-Resistance-Associated Protein 1 in Small Cell Lung Cancer. *PLoS One*. **2013**, *8*, e63404. doi: 10.1371/journal.pone.0063404.
164. Liu, Y.; Adachi, M.; Zhao, S.; Hareyama, M.; Koong, A.C.; Luo, D.; Rando, T.A.; Imai, K.; Shinomura, Y. Preventing oxidative stress: A new role for XBP1. *Cell Death Differ*. **2009**, *16*, 847–57. doi: 10.1038/cdd.2009.14.
165. Banning, A.; Kipp, A.; Schmitmeier, S.; Löwinger, M.; Florian, S.; Krehl, S.; Thalmann, S.; Thierbach, R.; Steinberg, P.; Brigelius-Flohé, R. Glutathione peroxidase 2 inhibits cyclooxygenase-2-mediated migration and invasion of HT-29 adenocarcinoma cells but supports their growth as tumors in nude mice. *Cancer Res*. **2008**, *68*, 9746–53. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1321.
166. Wu, Z.; Huang, M.; Gong, Y.; Lin, C.; Guo, W. BRAF and EGFR inhibitors synergize to increase cytotoxic effects and decrease stem cell capacities in BRAF(V600E)-mutant colorectal cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2018**, *50*, 355–61. doi: 10.1093/abbs/gmy018.
167. Emmink, B.L.; Laoukili, J.; Kipp, A.P.; Koster, J.; Govaert, K.M.; Fatrai, S.; Verheem, A.; Steller, E.J.A.; Brigelius-Flohé, R.; Jimenez, C.R.; et al. GPx2 suppression of H₂O₂ stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res*. **2014**, *74*, 6717–30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1645.
168. Safaee Ardekani, G.; Jafarnejad, S.M.; Tan, L.; Saeedi, A.; Li, G. The Prognostic Value of BRAF Mutation in Colorectal Cancer and Melanoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. **2012**, *7*, e47054. doi: 10.1371/journal.pone.0047054.
169. Nakaji, Y.; Oki, E.; Nakanishi, R.; Ando, K.; Sugiyama, M.; Nakashima, Y.; Yamashita, N.; Saeki, H.; Oda, Y.; Maehara, Y. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*. **2017**, *143*, 151-60. doi: 10.1007/s00432-016-2275-4.
170. Jin, Z.; Sinicrope, F.A. Advances in the therapy of BRAF^{V600E} metastatic colorectal cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther*. **2019**, *19*, 823–9. doi: 10.1080/14737140.2019.1661778.
171. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R.A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov*. **2006**, *5*, 835–44. doi: 10.1038/nrd2130.
172. Dunne-Daly, C.F. Principles of radiotherapy and radiobiology. *Semin. Oncol. Nurs*. **1999**, *15*, 250–9. doi: 10.1016/s0749-2081(99)80054-0.
173. Ventero Martín, M. Evaluación de los genes MGMT, SOCS1 y SOCS3 como marcadores moleculares de quimio y radorresistencia en modelos celulares de Glioblastoma humano. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2019.
174. Gorelick, N.; Jackson, E.; Tyler, B.; Brem, H. Interstitial Chemotherapy and Polymer Drug Delivery. In *Handbook of Brain Tumor Chemotherapy, Molecular Therapeutics, and Immunotherapy*, 2nd ed.; Academic Press, 2018; pp. 155–165.
175. Yoshida, M.; Horinouchi, S.; Beppu, T. Trichostatin A and trapoxin: Novel chemical probes

- for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *BioEssays*. **1995**, *17*, 423–30. doi: 10.1002/bies.950170510.
176. Villar-Garea, A.; Esteller, M. Histone deacetylase inhibitors: Understanding a new wave of anticancer agents. *Int. J. Cancer*. **2004**, *112*, 171–8. doi: 10.1002/ijc.20372.
177. Shankar, S.; Srivastava, R.K. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2008**, *615*, 261–98. doi: 10.1007/978-1-4020-6554-5_13.
178. Yi, M.; Dong, B.; Qin, S.; Chu, Q.; Wu, K.; Luo, S. Advances and perspectives of PARP inhibitors. *Exp. Hematol. Oncol.* **2019**, *8*, 29. doi: 10.1186/s40164-019-0154-9.
179. Chandrashekar, D.S.; Bashel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia*. **2017**, *19*, 649–58. doi: 10.1016/j.neo.2017.05.002.
180. Ryuichi, K.; Yoshihiro, Y. D-Amino-Acid oxidase and its physiological function. *Int. J. Biochem.* **1992**, *24*, 519–24. doi: 10.1016/0020-711x(92)90322-r.
181. Sanchez-Puelles, J.M.; Sanz, J.M.; Garcia, J.L.; Garcia, E. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 153–9. doi: 10.1111/j.1432-1033.1992.tb19840.x.
182. Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Piloni, M.S.; Ross, B.D. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: a cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 185–93. doi: 10.1089/hum.1998.9.2-185.
183. Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Piloni, M.S.; Ross, B.D. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: A cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 185–193. doi: 10.1089/hum.1998.9.2-185.
184. Noch, E.K.; Ramakrishna, R.; Magge, R. Challenges in the Treatment of Glioblastoma: Multisystem Mechanisms of Therapeutic Resistance. *World Neurosurg.* **2018**, *116*, 505–17. doi: 10.1016/j.wneu.2018.04.022.
185. Ohgaki, H.; Kleihues, P. The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 764–72. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
186. Nakamura, Y.; Hattori, N.; Iida, N.; Yamashita, S.; Mori, A.; Kimura, K.; Yoshino, T.; Ushijima, T. Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF-mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway. *Cancer Lett.* **2017**, *402*, 100–9. doi: 10.1016/j.canlet.2017.05.017.
187. Roma, C.; Rachiglio, A.M.; Pasquale, R.; Fenizia, F.; Iannaccone, A.; Tatangelo, F.; Antinolfi, G.; Parrella, P.; Graziano, P.; Sabatino, L.; et al. BRAF V600E mutation in metastatic colorectal cancer: Methods of detection and correlation with clinical and pathologic features. *Cancer Biol. Ther.* **2016**, *17*, 840–8. doi: 10.1080/15384047.2016.1195048.
188. McCubrey, J.A.; Milella, M.; Tafuri, A.; Martelli, A.M.; Lunghi, P.; Bonati, A.; Cervello, M.; Lee, J.T.; Steelman, L.S. Targeting the Raf/MEK/ERK pathway with small-molecule inhibitors. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2008**, *9*, 614–30.
189. Andreadi, C.; Noble, C.; Patel, B.; Jin, H.; Aguilar Hernandez, M.M.; Balmanno, K.; Cook, S.J.; Pritchard, C. Regulation of MEK/ERK pathway output by subcellular localization of B-Raf.

- Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 67–72. doi: 10.1042/BST20110621.
190. Holderfield, M.; Deuker, M.M.; McCormick, F.; McMahon, M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat. Rev. Cancer.* **2014**, *14*, 455–67. doi: 10.1038/nrc3760.
191. Galanopoulos, M.; Papanikolaou, I.S.; Zografos, E.; Viazis, N.; Papatheodoridis, G.; Karamanolis, D.; Marinou, E.; Mantzaris, G.J.; Gazouli, M. Comparative study of mutations in single nucleotide polymorphism loci of KRAS and BRAF genes in patients who underwent screening colonoscopy, with and without premalignant intestinal polyps. *Anticancer Res.* **2017**, *37*, 651–7. doi: 10.21873/anticancerres.11360.
192. Potrony, M.; Badenas, C.; Naerhuyzen, B.; Aguilera, P.; Puig-Butille, J.A.; Tell-Marti, G.; Díaz, A.; Carrera, C.; Alos, L.; Delahaye, N.; et al. Time and tumor type (primary or metastatic) do not influence the detection of BRAF/NRAS mutations in formalin fixed paraffin embedded samples from melanomas. *Clin. Chem. Lab. Med.* **2016**, *54*, 1733–8. doi: 10.1515/cclm-2015-1048.
193. Sakata-Yanagimoto, M.; Enami, T.; Yokoyama, Y.; Chiba, S. Disease-specific mutations in mature lymphoid neoplasms: Recent advances. *Cancer Sci.* **2014**, *105*, 623–9. doi: 10.1111/cas.12408.
194. De Langen, A.J.; Smit, E.F. Therapeutic approach to treating patients with BRAF-mutant lung cancer: Latest evidence and clinical implications. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2017**, *9*, 46–58. doi: 10.1177/1758834016670555.
195. Cohen, R.; Cervera, P.; Svrcek, M.; Pellat, A.; Dreyer, C.; de Gramont, A.; André, T. BRAF-Mutated Colorectal Cancer: What Is the Optimal Strategy for Treatment? *Curr. Treat. Options Oncol.* **2017**, *18*, 9. doi: 10.1007/s11864-017-0453-5.
196. Hall, R.D.; Kudchadkar, R.R. Braf mutations: Signaling, epidemiology, and clinical experience in multiple malignancies. *Cancer Control.* **2014**, *21*, 221–30. doi: 10.1177/107327481402100307.
197. Hyman, D.M.; Puzanov, I.; Subbiah, V.; Faris, J.E.; Chau, I.; Blay, J.-Y.; Wolf, J.; Raje, N.S.; Diamond, E.L.; Hollebecque, A.; et al. Vemurafenib in Multiple Nonmelanoma Cancers with BRAF V600 Mutations. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 726–36. doi: 10.1056/NEJMoa1502309.
198. Loupakis, F.; Cremolini, C.; Salvatore, L.; Masi, G.; Sensi, E.; Schirripa, M.; Michelucci, A.; Pfanner, E.; Brunetti, I.; Lupi, C.; et al. FOLFOXIRI plus bevacizumab as first-line treatment in BRAF mutant metastatic colorectal cancer. *Eur. J. Cancer.* **2014**, *50*, 57–63. doi: 10.1016/j.ejca.2013.08.024.
199. Yan, Y.; Grothey, A. Molecular profiling in the treatment of colorectal cancer: Focus on regorafenib. *Onco. Targets. Ther.* **2015**, *8*, 2949–57. doi: 10.2147/OTT.S79145.
200. Wan, P.T.C.; Garnett, M.J.; Roe, S.M.; Lee, S.; Niculescu-Duvaz, D.; Good, V.M.; Project, C.G.; Jones, C.M.; Marshall, C.J.; Springer, C.J.; et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* **2004**, *116*, 855–67. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00215-6.
201. Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Fournier, K.F.; Wang, H.; Marquis, L.; Abbruzzese, J.L.; Gallick, G.E.; Logsdon, C.D.; McConkey, D.J.; Choi, W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5820–8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2819.
202. Loukopoulos, P.; Kanetaka, K.; Takamura, M.; Shibata, T.; Sakamoto, M.; Hirohashi, S.

- Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas*. **2004**, *29*, 193–203. doi: 10.1097/00006676-200410000-00004.
203. Hempen, P.M.; Kurpad, H.; Calhoun, E.S.; Abraham, S.; Kern, S.E. A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 445. doi: 10.1002/humu.9120.
204. Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature*. **2000**, *408*, 307–10. doi: 10.1038/35042675.
205. Kruiswijk, F.; Labuschagne, C.F.; Vousden, K.H. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 393–405. doi: 10.1038/nrm4007.
206. Nogueira, V.; Hay, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–14. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1424.
207. Doskey, C.M.; Buranasudja, V.; Wagner, B.A.; Wilkes, J.G.; Du, J.; Cullen, J.J.; Buettner, G.R. Tumor cells have decreased ability to metabolize H₂O₂: Implications for pharmacological ascorbate in cancer therapy. *Redox Biol.* **2016**, *10*, 274–84. doi: 10.1016/j.redox.2016.10.010.
208. De Jong, W.H.; Borm, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomedicine*. **2008**, *3*, 133–49. doi: 10.2147/ijn.s596.
209. Lankveld, D.P.K.; Oomen, A.G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost - de Jong, A.; Noorlander, C.W.; Van Eijkeren, J.C.H.; Geertsma, R.E.; De Jong, W.H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*. **2010**, *31*, 8350–61. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.045.
210. Golini, P.; Bianchi, D.; Battistel, E.; Cesti, P.; Tassinari, R. Immobilization of d-amino acid oxidase from different yeasts: Characterization and application in the deamination of cephalosporin C. *Enzyme Microb. Technol.* **1995**, *17*, 324–9. doi: 10.1016/0141-0229(94)00027-1
211. Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Arminsen, P.; Sabuquillo, P.; Guisán, J.M. Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, *7*, 173–9. doi: 10.1016/S1381-1177(99)00040-5
212. Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 98–105. doi: 10.1002/(sici)1097-0290(20000405)68:1<98::aid-bit12>3.0.co;2-t.
213. López-Gallego, F.; Betancor, L.; Mateo, C.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 70–5. doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.05.021.
214. Zheng, H.; Wang, X.; Chen, J.; Zhu, K.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Yang, S.; Jiang, W. Expression, purification, and immobilization of His-tagged D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 683–9. doi: 10.1007/s00253-005-0158-8.

Bibliografía

215. Kuan, I.; Liao, R.; Hsieh, H.; Chen, K.; Yu, C. Properties of *Rhodotorula gracilis* d-Amino Acid Oxidase Immobilized on Magnetic Beads through His-Tag. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *105*, 110–5. doi: 10.1263/jbb.105.110.
216. Hsieh, H.C.; Kuan, I.C.; Lee, S.L.; Tien, G.Y.; Wang, Y.J.; Yu, C.Y. Stabilization of d-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 557–63. doi: 10.1007/s10529-008-9894-z.
217. Bava, A.; Gornati, R.; Cappellini, F.; Caldinelli, L.; Pollegioni, L.; Bernardini, G. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: A potential novel approach for cancer enzymatic therapy. *Nanomedicine.* **2013**, *8*, 1797–806. doi: 10.2217/nnm.12.187.
218. Chien, L.-J.; Lee, C.-K. Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 223–30. doi: 10.1002/bit.21750.
219. Wang, S.J.; Yu, C.Y.; Kuan, I.C. Stabilization of native and double d-amino acid oxidases from *Rhodospiridium toruloides* and *Trigonopsis variabilis* by immobilization on streptavidin-coated magnetic beads. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1973–81. doi: 10.1007/s10529-008-9782-6.
220. Dobson, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 55–60. doi: 10.1002/ddr.20067.
221. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaria, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Nano today.* **2007**, *2*, 22-32. doi: 10.1016/S1748-0132(07)70084-1.
222. Dennis, C.L.; Ivkov, R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **2013**, *29*, 715–29. doi: 10.3109/02656736.2013.836758.
223. Thiesen, B.; Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hyperth.* **2008**, *24*, 467–74. doi: 10.1080/02656730802104757.
224. Yoo, D.; Lee, J.H.; Shin, T.H.; Cheon, J. Theranostic magnetic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 863–74. doi: 10.1021/ar200085c. Epub 2011 Aug 8.
225. Pollegioni, L.; Caldinelli, L.; Molla, G.; Sacchi, S.; Pilone, M.S. Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: A comparison between proteins from different sources. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 467–73. doi: 10.1021/bp034206q.
226. Ding, S.; Cargill, A.A.; Medintz, I.L.; Claussen, J.C. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 242–50. doi: 10.1016/j.copbio.2015.04.005.
227. Mohamed, H.; Ahmed, O. Methods of Enzyme Immobilization. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.* **2016**, *7*, 385–92.
228. Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Rodriguez, V.; Fuentes, M.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Use of Physicochemical Tools to Determine the Choice of Optimal Enzyme: Stabilization of D-Amino Acid Oxidase. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 784–8. doi: 10.1021/bp025761f.
229. Bello Gil, D. Desarrollo de sistemas para la inmovilización de proteínas y sus aplicaciones biotecnológicas. Universidad Miguel Hernández de Elche, 2013.
230. Hosta-Rigau, L.; Olmedo, I.; Arbiol, J.; Cruz, L.J.; Kogan, M.J.; Albericio, F. Multifunctionalized gold nanoparticles with peptides targeted to gastrin-releasing peptide receptor of a tumor cell line. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1070–8. doi: 10.1021/bc1000164.
231. Saxena, V.K.; Deb, R.; Shrivastava, S.; Kantaraja, C.; Kumar, A.; Kumar, S. Functionalizing

- gold nanoparticles with bluetongue virus multiple peptide antigens utilizing gold-thiol interaction: A novel approach to develop pen side test. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 1531–6. doi: 10.1016/j.rvsc.2012.04.013.
232. Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R.R.; Sastry, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir.* **2005**, *21*, 10644–54. doi: 10.1021/la0513712.
233. Sun, T.; Zhang, Y.S.; Pang, B.; Hyun, D.C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12320–64. doi: 10.1002/anie.201403036.
234. Connor, E.E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C.J.; Wyatt, M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small.* **2005**, *1*, 325–7. doi: 10.1002/sml.200400093.
235. Abadeer, N.S.; Murphy, C.J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C.* **2016**, *120*, 4691–716. doi: 10.1021/acs.jpcc.5b11232.
236. Hu, X.; Zhang, Y.; Ding, T.; Liu, J.; Zhao, H. Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 990. doi: 10.3389/fbioe.2020.00990.
237. Ramalingam, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *271*, 101989. doi: 10.1016/j.cis.2019.101989.
238. Pereda, M.; Poncelet, D.; Renard, D. Characterization of Core-Shell Alginate Capsules. *Food Biophys.* **2019**, *14*, 467–78.
239. Marchi, S.; Giorgi, C.; Suski, J.M.; Agnoletto, C.; Bononi, A.; Bonora, M.; De Marchi, E.; Missiroli, S.; Patergnani, S.; Poletti, F.; et al. Mitochondria-Ros Crosstalk in the Control of Cell Death and Aging. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 329635. doi: 10.1155/2012/329635.
240. Zhong, H.; Song, R.; Pang, Q.; Liu, Y.; Zhuang, J.; Chen, Y.; Hu, J.; Hu, J.; Liu, Y.; Liu, Z.; et al. Propofol inhibits parthanatos via ROS–ER–calcium–mitochondria signal pathway in vivo and vitro. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 932. doi: 10.1038/s41419-018-0996-9.
241. Deniaud, A.; Sharaf El Dein, O.; Maillier, E.; Poncet, D.; Kroemer, G.; Lemaire, C.; Brenner, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene.* **2008**, *27*, 285–99. doi: 10.1038/sj.onc.1210638.
242. Park, W.H. Hydrogen peroxide inhibits the growth of lung cancer cells via the induction of cell death and G1-phase arrest. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 1787–94. doi: 10.3892/or.2018.6535.
243. Park, W.H. Anti-apoptotic effect of caspase inhibitors on H2O2-treated HeLa cells through early suppression of its oxidative stress. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 2413–21. doi: 10.3892/or.2014.3084.
244. Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium.* **2011**, *50*, 211–21. doi: 10.1016/j.ceca.2011.03.003.
245. Zhang, F.; Xie, R.; Munoz, F.M.; Lau, S.S.; Monks, T.J. PARP-1 Hyperactivation and Reciprocal Elevations in Intracellular Ca²⁺ During ROS-Induced Nonapoptotic Cell Death. *Toxicol. Sci.* **2014**, *140*, 118–34. doi: 10.1093/toxsci/kfu073.
246. Görlach, A.; Klappa, P.; Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxidants Redox Signal.* **2006**, *8*, 1391–418.

doi: 10.1089/ars.2006.8.1391.

247. Daugas, E.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Larochette, N.; Prévost, M.; Leber, B.; Andrews, D.; Penninger, J.; et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **2000**, *14*, 729–39.
248. Akay, C.; Thomas, C.; Gazzit, Y. Arsenic Trioxide and Paclitaxel Induce Apoptosis by Different Mechanisms. *Cell Cycle.* **2004**, *3*, 324–34.
249. Susin, S.A.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Samejima, K.; Zamzami, N.; Loeffler, M.; Costantini, P.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Prévost, M.C.; et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 571–80. doi: 10.1084/jem.192.4.571.
250. Kim, E.K.; Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, *1802*, 396–405. doi: 10.1016/j.bbadis.2009.12.009.
251. Rezatabar, S.; Karimian, A.; Rameshknia, V.; Parsian, H.; Majidinia, M.; Kopi, T.A.; Bishayee, A.; Sadeghinia, A.; Yousefi, M.; Monirialamdari, M.; et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 14951–65. doi: 10.1002/jcp.28334.
252. Ip, Y.T.; Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - From inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 205–19. doi: 10.1016/s0955-0674(98)80143-9.
253. Lee, S.; Rauch, J.; Kolch, W. Targeting MAPK signaling in cancer: Mechanisms of drug resistance and sensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1102. doi: 10.3390/ijms21031102.
254. Lüschen, S.; Scherer, G.; Ussat, S.; Ungefroren, H.; Adam-Klages, S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces TNF-induced activation of NF- κ B, elicits caspase activity, and enhances cytotoxicity. *Exp. Cell Res.* **2004**, *293*, 196–206. doi: 10.1016/j.yexcr.2003.10.009.
255. Cheng, Y.; Qiu, F.; Ye, Y.C.; Guo, Z.M.; Tashiro, S.I.; Onodera, S.; Ikejima, T. Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappa B survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells. *FEBS J.* **2009**, *276*, 1291–306. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06864.x.
256. Lee, J.S.; Surh, Y.J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* **2005**, *224*, 171–84. doi: 10.1016/j.canlet.2004.09.042.
257. Shin, J.M.; Lee, K.M.; Lee, H.J.; Yun, J.H.; Nho, C.W. Physalin A regulates the Nrf2 pathway through ERK and p38 for induction of detoxifying enzymes. *BMC Complement. Altern. Med.* **2019**, *19*, 101. doi: 10.1186/s12906-019-2511-y.
258. Bellezza, I.; Mierla, A.L.; Minelli, A. Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers (Basel).* **2010**, *2*, 483–97. doi: 10.3390/cancers2020483.
259. Jayakumar, S.; Pal, D.; Sandur, S.K. Nrf2 facilitates repair of radiation induced DNA damage through homologous recombination repair pathway in a ROS independent manner in cancer cells. *Mutat. Res.* **2015**, *779*, 33–45. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2015.06.007.
260. Sisinni, L.; Pietrafesa, M.; Lepore, S.; Maddalena, F.; Condelli, V.; Esposito, F.; Landriscina, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in breast cancer: The balance between apoptosis and autophagy and its role in drug resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 857. doi: 10.3390/ijms20040857.

261. Xu, Z.; Wang, H.; Wei, S.; Wang, Z.; Ji, G. Inhibition of ER stress-related IRE1 α /CREB/NLRP1 pathway promotes the apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cell. *Mol. Immunol.* **2018**, *101*, 377–85. doi: 10.1016/j.molimm.2018.07.002.
262. Corazzari, M.; Rapino, F.; Ciccocanti, F.; Giglio, P.; Antonioli, M.; Conti, B.; Fimia, G.M.; Lovat, P.E.; Piacentini, M. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 946–58. doi: 10.1038/cdd.2014.183.
263. Cullinan, S.B.; Zhang, D.; Hannink, M.; Arvais, E.; Kaufman, R.J.; Diehl, J.A. Nrf2 Is a Direct PERK Substrate and Effector of PERK-Dependent Cell Survival. *Mol. Cell. Biol.* **2003**, *23*, 7198–209. doi: 10.1128/mcb.23.20.7198-7209.2003.
264. Avril, T.; Vauléon, E.; Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis.* **2017**, *6*, e373. doi: 10.1038/oncsis.2017.72.
265. Caputo, F.; Santini, C.; Bardasi, C.; Cerma, K.; Casadei-Gardini, A.; Spallanzani, A.; Andrikou, K.; Cascinu, S.; Gelsomino, F. BRAF-mutated colorectal cancer: Clinical and molecular insights. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5369. doi: 10.3390/ijms20215369.
266. Ducreux, M.; Chamseddine, A.; Laurent-Puig, P.; Smolenschi, C.; Hollebecque, A.; Dartigues, P.; Samallin, E.; Boige, V.; Malka, D.; Gelli, M. Molecular Targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2019**, *11*, 1758835919856494. doi: 10.1177/1758835919856494.
267. Roux, A.; Caire, F.; Guyotat, J.; Menei, P.; Metellus, P.; Pallud, J. Carmustine wafer implantation for high-grade gliomas: Evidence-based safety efficacy and practical recommendations from the Neuro-oncology Club of the French Society of Neurosurgery. *Neurochirurgie.* **2017**, *63*, 433–43. doi: 10.1016/j.neuchi.2017.07.003.
268. La Rocca, R. V.; Maximilian Mehdorn, H. Localized BCNU chemotherapy and the multimodal management of malignant glioma. *Curr. Med. Res. Opin.* **2009**, *25*, 149–60. doi: 10.1185/03007990802611935.
269. Gutenberg, A.; Lumenta, C.B.; Braunsdorf, W.E.K.; Sabel, M.; Mehdorn, H.M.; Westphal, M.; Giese, A. The combination of carmustine wafers and temozolomide for the treatment of malignant gliomas. A comprehensive review of the rationale and clinical experience. *J. Neurooncol.* **2013**, *113*, 163–74. doi: 10.1007/s11060-013-1110-x.
270. Lombardi, G.; Della Puppa, A.; Zustovich, F.; Pambuku, A.; Farina, P.; Fiduccia, P.; Roma, A.; Zagonel, V. The combination of carmustine wafers and fotemustine in recurrent glioblastoma patients: A monoinstitutional Experience. *Biomed Res. Int.* **2014**, *2014*, 678191. doi: 10.1155/2014/678191.
271. Da-Silva, W.S.; Gómez-Puyou, A.; De Gómez-Puyou, M.T.; Moreno-Sanchez, R.; De Felice, F.G.; De Meis, L.; Oliveira, M.F.; Galina, A. Mitochondrial bound hexokinase activity as a preventive antioxidant defense. Steady-state ADP formation as a regulatory mechanism of membrane potential and reactive oxygen species generation in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 39846–55. doi: 10.1074/jbc.M403835200.
272. Mann, B.S.; Johnson, J.R.; Cohen, M.H.; Justice, R.; Pazdur, R. FDA Approval Summary: Vorinostat for Treatment of Advanced Primary Cutaneous T-Cell Lymphoma. *Oncologist.* **2007**, *12*, 1247–52. doi: 10.1634/theoncologist.12-10-1247.
273. Grant, C.; Rahman, F.; Piekarz, R.; Peer, C.; Frye, R.; Robey, R.W.; Gardner, E.R.; Figg, W.D.; Bates, S.E. Romidepsin: A new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2010**, *10*, 997–1008. doi:

- 10.1586/era.10.88.
274. Sawas, A.; Radeski, D.; O'Connor, O.A. Belinostat in patients with refractory or relapsed peripheral T-cell lymphoma: a perspective review. *Ther. Adv. Hematol.* **2015**, *6*, 202–8. doi: 10.1177/2040620715592567.
275. Moore, D. Panobinostat (farydak): A novel option for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *P T.* **2016**, *41*, 296–300.
276. Groselj, B.; Sharma, N.L.; Hamdy, F.C.; Kerr, M.; Kiltie, A.E. Histone deacetylase inhibitors as radiosensitisers: Effects on DNA damage signalling and repair. *Br. J. Cancer.* **2013**, *108*, 748–54. doi: 10.1038/bjc.2013.21.
277. Rasheed, W.; Bishton, M.; Johnston, R.W.; Prince, H.M. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2008**, *8*, 413–32. doi: 10.1586/14737140.8.3.413.
278. Farmer, H.; McCabe, H.; Lord, C.J.; Tutt, A.H.J.; Johnson, D.A.; Richardson, T.B.; Santarosa, M.; Dillon, K.J.; Hickson, I.; Knights, C.; et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature.* **2005**, *434*, 917–21. doi: 10.1038/nature03445.
279. Beijersbergen, R.L.; Wessels, L.F.A.; Bernards, R. Synthetic lethality in cancer therapeutics. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2017**, *1*, 141–61. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-042016-073434.
280. Murai, J.; Pommier, Y. PARP Trapping Beyond Homologous Recombination and Platinum Sensitivity in Cancers. *Annu. Rev. Cancer Biol.* **2019**, *3*, 131–50. doi: 10.1146/annurev-cancerbio-030518-055914.
281. Min, A.; Im, S.A. PARP inhibitors as therapeutics: Beyond modulation of parylation. *Cancers (Basel).* **2020**, *12*, 394. doi: 10.3390/cancers12020394.
282. Matsuno, Y.; Hyodo, M.; Fujimori, H.; Shimizu, A.; Yoshioka, K.I. Sensitization of cancer cells to radiation and topoisomerase I inhibitor camptothecin using inhibitors of PARP and other signaling molecules. *Cancers (Basel).* **2018**, *10*, 364. doi: 10.3390/cancers10100364.
283. Curtin, N.J.; Szabo, C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: Anticancer therapy and beyond. *Mol. Aspects Med.* **2013**, *34*, 1217–56. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.006.
284. Godwin, P.; Baird, A.M.; Heavey, S.; Barr, M.P.; O'Byrne, K.J.; Gately, K. Targeting nuclear factor-kappa B to overcome resistance to chemotherapy. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 120. doi: 10.3389/fonc.2013.00120.
285. Mokim Ahmed, K.; Li, J.J. NF-κB-mediated adaptive resistance to ionizing radiation. *Free Radic. Biol. Med.* **2008**, *44*, 1–13. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.022.
286. Wang, X.J.; Sun, Z.; Villeneuve, N.F.; Zhang, S.; Zhao, F.; Li, Y.; Chen, W.; Yi, X.; Zheng, W.; Wondrak, G.T.; et al. Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis.* **2008**, *29*, 1235–43. doi: 10.1093/carcin/bgn095.
287. Soini, Y.; Eskelinen, M.; Juvonen, P.; Kärjä, V.; Haapasaari, K.M.; Saarela, A.; Karihtala, P. Nuclear Nrf2 expression is related to a poor survival in pancreatic adenocarcinoma. *Pathol. Res. Pract.* **2014**, *210*, 35–9. doi: 10.1016/j.prp.2013.10.001.
288. Jiang, T.; Chen, N.; Zhao, F.; Wang, X.J.; Kong, B.; Zheng, W.; Zhang, D.D. High levels of Nrf2 determine chemoresistance in type II endometrial cancer. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 5486–96. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0713.
289. Zhu, J.; Wang, H.; Ji, X.; Zhu, L.; Sun, Q.; Cong, Z.; Zhou, Y.; Liu, H.; Zhou, M. Differential Nrf2

- expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma. *Oncol. Lett.* **2014**, *7*, 693–8. doi: 10.3892/ol.2013.1760.
290. Nitta, R.T.; Li, G. The invasive nature of glioblastoma. *World Neurosurg.* **2013**, *80*, 279–80. doi: 10.1016/j.wneu.2011.09.036.
291. Zhu, J.; Wang, H.; Sun, Q.; Ji, X.; Zhu, L.; Cong, Z.; Zhou, Y.; Liu, H.; Zhou, M. Nrf2 is required to maintain the self-renewal of glioma stem cells. *BMC Cancer.* **2013**, *13*, 380. doi: 10.1186/1471-2407-13-380.
292. Jia, Y.; Wang, H.; Wang, Q.; Ding, H.; Wu, H.; Pan, H. Silencing Nrf2 impairs glioma cell proliferation via AMPK-activated mTOR inhibition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *469*, 665–71. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.12.034.
293. Tsai, W.C.; Hueng, D.Y.; Lin, C.R.; Yang, T.C.K.; Gao, H.W. Nrf2 expressions correlate with WHO grades in gliomas and meningiomas. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 722. doi: 10.3390/ijms17050722.
294. Nascimento, E.F.R.; Ribeiro, M.L.; Magro, D.O.; Carvalho, J.; Kanno, D.T.; Martinez, C.A.R.; Coy, C.S.R. Tissue expression of the genes MUTYH and OGG1 in patients with sporadic colorectal cancer. *Arq. Bras. Cir. Dig.* **2017**, *30*, 98–102. doi: 10.1590/0102-6720201700020005.
295. Hlavata, I.; Mohelnikova-Duchonova, B.; Vaclavikova, R.; Liska, V.; Pitule, P.; Novak, P.; Bruha, J.; Vycital, O.; Holubec, L.; Treska, V.; et al. The role of ABC transporters in progression and clinical outcome of colorectal cancer. *Mutagenesis.* **2012**, *27*, 187–96. doi: 10.1093/mutage/ger075.
296. Mohelnikova-Duchonova, B.; Brynychova, V.; Oliverius, M.; Honsova, E.; Kala, Z.; Muckova, K.; Soucek, P. Differences in transcript levels of ABC transporters between pancreatic adenocarcinoma and nonneoplastic tissues. *Pancreas.* **2013**, *42*, 707–16. doi: 10.1097/MPA.0b013e318279b861.
297. Tivnan, A.; Zakaria, Z.; O’Leary, C.; Kögel, D.; Pokorný, J.L.; Sarkaria, J.N.; Prehn, J.H.M. Inhibition of multidrug resistance protein 1 (MRP1) improves chemotherapy drug response in primary and recurrent glioblastoma multiforme. *Front. Neurosci.* **2015**, *9*, 218. doi: 10.3389/fnins.2015.00218.
298. Munoz, M.; Henderson, M.; Haber, M.; Norris, M. Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life.* **2007**, *59*, 752–7. doi: 10.1080/15216540701736285.
299. Chen, M.; Li, D.; Gong, N.; Wu, H.; Su, C.; Xie, C.; Xiang, H.; Lin, C.; Li, X. miR-133b down-regulates ABCC1 and enhances the sensitivity of CRC to anti-tumor drugs. *Oncotarget.* **2017**, *8*, 52983–94. doi: 10.18632/oncotarget.17677.
300. Bostwick, D.G.; Alexander, E.E.; Singh, R.; Shan, A.; Qian, J.; Santella, R.M.; Oberley, L.W.; Tan, T.; Zhong, W.; Jiang, X.; et al. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer.* **2000**, *89*, 123–34.
301. Ho, J.C.; Zheng, S.; Comhair, S.A.A.; Farver, C.; Erzurum, S.C. Differential Expression of Manganese Superoxide Dismutase and Catalase in Lung Cancer. *Cancer Res.* **2001**, *61*, 8578–85.
302. Lauer, C. Impairment of peroxisomal biogenesis in human colon carcinoma. *Carcinogenesis.* **1999**, *20*, 985–9. doi: 10.1093/carcin/20.6.985.

Bibliografia

303. Verrax, J.; Pedrosa, R.; Beck, R.; Dejeans, N.; Taper, H.; Calderon, P. In Situ Modulation of Oxidative Stress: A Novel and Efficient Strategy to Kill Cancer Cells. *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 1821–30. doi: 10.2174/092986709788186057.
304. Beck, R.; Pedrosa, R.C.; Dejeans, N.; Glorieux, C.; Levêque, P.; Gallez, B.; Taper, H.; Eeckhoudt, S.; Knoops, L.; Calderon, P.B.; et al. Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. *Invest. New Drugs.* **2011**, *29*, 891–900. doi: 10.1007/s10637-010-9441-3.
305. Glorieux, C.; Sandoval, J.M.; Fattaccioli, A.; Dejeans, N.; Garbe, J.C.; Dieu, M.; Verrax, J.; Renard, P.; Huang, P.; Calderon, P.B. Chromatin remodeling regulates catalase expression during cancer cells adaptation to chronic oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **2016**, *99*, 436–50. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.08.031.
306. Glorieux, C.; Dejeans, N.; Sid, B.; Beck, R.; Calderon, P.B.; Verrax, J. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1384–90. doi: 10.1016/j.bcp.2011.06.007.
307. Glorieux, C.; Auquier, J.; Dejeans, N.; Sid, B.; Demoulin, J.B.; Bertrand, L.; Verrax, J.; Calderon, P.B. Catalase expression in MCF-7 breast cancer cells is mainly controlled by PI3K/Akt/mTor signaling pathway. *Biochem. Pharmacol.* **2014**, *89*, 217–23. doi: 10.1016/j.bcp.2014.02.025.
308. Guo, B.; Liao, W.; Wang, S. The clinical significance of glutathione peroxidase 2 in glioblastoma multiforme. *Transl. Neurosci.* **2021**, *12*, 32–9. doi: 10.1515/tnsci-2021-0005.
309. Murawaki, Y.; Tsuchiya, H.; Kanbe, T.; Harada, K.; Yashima, K.; Nozaka, K.; Tanida, O.; Kohno, M.; Mukoyama, T.; Nishimuki, E.; et al. Aberrant expression of selenoproteins in the progression of colorectal cancer. *Cancer Lett.* **2008**, *259*, 218–30. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.019.
310. Chiu, S.T.; Hsieh, F.J.; Chen, S.W.; Chen, C.L.; Shu, H.F.; Li, H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and real-time reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2005**, *14*, 437–43. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-04-0396.
311. Li, F.; Dai, L.; Niu, J. GPX2 silencing relieves epithelial–mesenchymal transition, invasion, and metastasis in pancreatic cancer by downregulating Wnt pathway. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235*, 7780–90. doi: 10.1002/jcp.29391.

ANEXO





ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

**El verdadero perdedor es aquel que tiene tanto
miedo a ganar que ni siquiera lo intenta.**

PEQUEÑA MISS SUNSHINE.

Article

CLytA-DAAO, Free and Immobilized in Magnetic Nanoparticles, Induces Cell Death in Human Cancer Cells

María Fuentes-Baile ^{1,2}, Daniel Bello-Gil ³, Elizabeth Pérez-Valenciano ³, Jesús M. Sanz ^{3,4}, Pilar García-Morales ^{2,3}, Beatriz Maestro ^{3,4}, María P. Ventero ¹, Cristina Alenda ¹, Víctor M. Barberá ^{2,5} and Miguel Saceda ^{2,3,*}

- ¹ Hospital General Universitario de Alicante, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), C/Maestro Alonso, 10, 03005 Alicante, Spain; mariafuentesbaile@gmail.com (M.F.-B.); maripazvm@gmail.com (M.P.V.); alenda.cris@gmail.com (C.A.)
 - ² Unidad de Investigación. Hospital General Universitario de Elche, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Camí de l'Almazara, 11, 03203 Elche (Alicante), Spain; pgarcia@umh.es (P.G.-M.); barbera_vicjua@gva.es (V.M.B.)
 - ³ Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, Ed. Torregaitán, 03202 Elche (Alicante), Spain; dabe_gil@yahoo.es (D.B.-G.); elizabethpv2908@gmail.com (E.P.-V.); jmsanz@cib.csic.es (J.M.S.); bmaestro35@gmail.com (B.M.)
 - ⁴ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), C/Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain
 - ⁵ Unidad de Genética Molecular. Hospital General Universitario de Elche. Camí de l'Almazara, 11, 03203 Elche (Alicante), Spain
- * Correspondence: msaceda@umh.es; Tel.: +34-966658432

Received: 13 January 2020; Accepted: 31 January 2020; Published: 3 February 2020



Abstract: D-amino acid oxidase (DAAO) catalyzes the oxidation of D-amino acids generating hydrogen peroxide, a potential producer of reactive oxygen species. In this study, we used a CLytA-DAAO chimera, both free and bound to magnetic nanoparticles, against colon carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, and glioblastoma cell lines. We found that the enzyme induces cell death in most of the cell lines tested and its efficiency increases significantly when it is immobilized in nanoparticles. We also tested this enzyme therapy in non-tumor cells, and we found that there is not cell death induction, or it is significantly lower than in tumor cells. The mechanism triggering cell death is apparently a classical apoptosis pathway in the glioblastoma cell lines, while in colon and pancreatic carcinoma cell lines, CLytA-DAAO-induced cell death is a necrosis. Our results constitute a proof of concept that an enzymatic therapy, based on magnetic nanoparticles-delivering CLytA-DAAO, could constitute a useful therapy against cancer and besides it could be used as an enhancer of other treatments such as epigenetic therapy, radiotherapy, and treatments based on DNA repair.

Keywords: magnetic nanoparticle; cancer therapy; reactive oxygen species; oxidative damage; cytotoxicity; choline-binding proteins

1. Introduction

Nowadays, cancer remains among the main causes of mortality [1]. Surgery followed by chemotherapy and radiotherapy are the most commonly used treatments against cancer. However, the selectivity of most drugs towards tumor cells is still too low. In addition, the low therapeutic index,

the lack of treatment specificity, and the appearance of drug-resistant clonal populations of cells often reduce the effectiveness of these therapies. In addition, another problem associated with the treatment of solid tumors is the access of drugs to tumor cells which is limited by poor vascularization and necrosis [2].

Due to its accelerated metabolism, tumor cells exhibit increased free radical levels in comparison with normal cells [3]. The high levels of free radicals in tumor cells make them more vulnerable to death due to oxidative stress, so this is a putative strategy for antitumor therapies.

A novel strategy for the treatment of solid tumors is to use enzymatic therapies based on the production of reactive oxygen species (ROS). An exogenous enzyme is directed to the tumor and then a non-toxic substrate of the enzyme is administered systemically, so that it can be converted into an active anticancer drug inside the tumors [4,5].

Our research group is studying the use of the D-amino acid oxidase (DAAO) from *Rhodotorula gracilis* for the treatment of cancer. DAAO catalyzes the oxidation of D-amino acids in alpha-ketoacids, ammonium, and H₂O₂. DAAO from yeasts present a very high catalytic activity and a stable interaction with the cofactor flavin-adenine dinucleotide (FAD) [6,7]. In addition, its substrate (D-amino acids) is not present endogenously, allowing a simple regulation of the enzymatic activity [8,9].

To prevent the enzyme from being degraded by the organism or not be able to reach the tumor, it is necessary to direct it specifically towards the tumor. Immobilization provides a support to the enzymes, and usually encompasses favorable conditions, such as increasing structural stability and/or enzyme specificity/activity, better kinetic properties, or extending its pH or temperature working-range [10,11]. Numerous methods have been implemented for enzyme immobilization, taking into account the intended application [12]. In this sense, magnetic nanoparticles (MNPs) have received increasing attention as enzyme carriers for biotechnological and biomedical applications [13].

MNPs can easily be recovered from aqueous solutions using an external magnetic field and exhibit useful properties such as high surface area-to-volume ratio, making possible an increase in the enzyme density, and the possibility to be surface modified [14]. In our study, we used a non-covalent site-specific immobilization of the enzyme, as this method uses mild conditions. To get this, we made use of the affinity tag CLytA, which is the choline-binding module of the amidase N-acetylmuramoyl-L-alanine (LytA) from *Streptococcus pneumoniae* [15]. The CLytA domain shows high affinity for choline and choline structural analogs, such as diethylaminoethanol (DEAE), and it is routinely used as an affinity tag for the single-step purification and immobilization of fusion proteins [16–18].

The chimera was specifically immobilized onto MNPs functionalized with DEAE. Both, free and immobilized, CLytA-DAAO chimera are able to induce cell death by increasing ROS production, which caused DNA damage in several colon carcinoma and pancreatic adenocarcinoma cell lines as well as in glioblastoma cell lines derived from primary cultures obtained in our laboratory directly from glioblastoma patients, at doses that are safe for non-tumor cells. Interestingly, the cell death evoked by the enzyme could be executed by apoptotic or necrotic mechanisms depending on the tumor origin.

The reasons to select these types of tumors in our study were their frequency, mortality, and resistance to other treatments and also our laboratory experience, since we have been working in these models for many years [19–23]. This localized therapy reduces the dose of drug needed, improving the effectiveness and decreasing adverse effects. Finally, in this study we demonstrate that, besides its own cell-death induction capacity, this kind of therapy is also able to potentiate the effect of other treatments, such as epigenetic treatments with histone deacetylase inhibitors, radiotherapy, and Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors on these poor prognosis types of cancer.

2. Materials and Methods

2.1. Cell Culture

The human pancreatic adenocarcinoma cell lines IMIM-PC-2, RWP-1, and Hs766T, the human colon carcinoma cell lines SW-480, SW-620, and HT-29, the non-tumor cell lines from human fibroblasts IMR90

and 1BR3.G, and the human ductal pancreatic cell line HPDE were donated by the Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM, Barcelona, Spain). The glioblastoma cell lines HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, and HGUE-GB-42 derived from primary cultures were established in our laboratory [24]. Differentiated mouse 3T3-L1 cells were donated by Dr. Vicente Micol of Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE, Elche, Spain) [25]. The lymphocytes primary cultures were obtained from blood samples of non-oncological patients at “Hospital General Universitario de Elche” (HGUE).

Colon carcinoma cell lines, pancreatic adenocarcinoma cell lines, adipocytes, and fibroblasts were maintained in Dubelcco’s Modified Eagle’s Medium (DMEM) High Glucose (Biowest, MO, USA) while glioblastoma cell lines were maintained in DMEM: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F12) (Biowest, MO, USA). HPDE cell line was cultured in keratinocyte serum-free (KSF) medium supplemented with epidermal growth factor and bovine pituitary extract (Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) as previously described [26]. The lymphocytes primary cultures were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 media (Biowest, MO, USA). DMEM, DMEM F-12 and RPMI 1640 media were supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biowest, MO, USA) and 1% (*v/v*) of a penicillin and streptomycin mixture (Biowest, MO, USA). Cells were incubated at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

2.2. Ethics Statement

Blood samples from non-oncological patients were collected from routine tests, after the signing of informed consent by the participants and with the approval of the Ethical and Clinical Research Committee of the HGUE (Elche, Spain).

2.3. CLytA-DAAO Production

CLytA-DAAO was obtained and isolated as previously described [27], with minor modifications. CLytA-DAAO protein was extracted from *Escherichia coli* BL21 (DE3) [28], which was transformed with the plasmid pCPC21 [29], and purified using the QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the protocol previously described [30]. This plasmid allows the overexpression of the CLytA-DAAO hybrid gene.

A single colony was grown in Luria–Bertani (LB) medium [31], supplemented with ampicillin (0.1 mg mL⁻¹) in orbital agitation at 37 °C. After reaching an optical density of 0.6, the expression of CLytA-DAAO gene was induced for 14 h at 30 °C by the addition of 0.5 mM of isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG), which allows the induction of the *lac* promoter. The cells were harvested by centrifugation, resuspended in sodium phosphate buffer 20 mM, NaCl 100 mM (pH 7.0) and then, adenine-flavin di-nucleotide (FAD) was added as cofactor of DAAO protein. Cells were lysed by sonication.

The resulting extract was centrifuged, and the supernatant obtained was purified by affinity chromatography. Purity of the eluted protein was checked by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis [32].

2.4. CLytA-DAAO Immobilization in MNPs

DEAE-FluidMAG magnetic nanoparticles (5 mg, 200 nm diameter, Chemicell, Berlin, Germany), equilibrated in 20 mM sodium phosphate 10% glycerol (*w/w*), at pH 7.5, were incubated with 500 μg of purified CLytA-DAAO, under mild circular agitation for 10 min at 25 °C. Glycerol was added as described to stabilize the DAAO structure [33]. Particles were then separated with a magnet (Chemicell, Berlin, Germany), followed by repeated washing steps in the equilibrate buffer previously used.

2.5. Determination of the Pure CLytA-DAAO Enzymatic Activity

D-amino acid oxidase activity of the fusion protein CLytA-DAAO was tested following the protocol described by Fonda and Anderson [34]. Formation of benzoyl-formic acid ($\epsilon_{252} = 12,253 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$),

produced by the hydrolysis of D-phenylglycine (15 mM) in 20 mM sodium phosphate buffer at pH 7.5, was determined spectrophotometrically at 252 nm, after stopping the reaction with glacial acetic acid. One unit (U) of enzymatic activity was defined as the amount of enzyme needed to produce 1 μmol of product per min at 25 °C and pH 7.5 [35].

2.6. Chemical Reagents and Treatments

The pan-caspase inhibitor carbobenzyloxy-Val-Ala-Asp- α -fluoromethylketone (Z-VAD-FMK) (Calbiochem[®], San Diego, CA, USA) was used at 25 μM to test caspase dependent apoptosis. Chloroquine (CQ) and Spautine-1 (SP) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were used at 10 μM to test autophagy. Necrostatine-1 (NC) (Sigma-Aldrich, MO, USA) was used at 20 μM to test necroptosis cell death. Ferrostatin-1 (Fe-1) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were used at 10 μM to test ferroptosis cell death. Trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich, MO, USA) was used at 0.1 μM and the PARP inhibitor III, 3,4-Dihydro-5[4-(1-piperindinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinoline (DPQ) (Calbiochem[®], San Diego, CA, USA) was used at 10 μM .

Radiotherapy treatment at 7 Gy was added to cells with a rate of 6 Gy min^{-1} using VARIANT 2100C linear accelerator in the radiotherapy Oncology Unit of the HGUE.

The Bax-inhibiting peptide, V5 (H-VPMLK-OH) (Calbiochem[®], San Diego, CA, USA) was used at 200 μM according to the manufacturer's instructions.

2.7. Cell Proliferation Assays

Cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) at a density of 4000 cells per well and incubated at 37 °C and 5% CO_2 for 24 h. After this time, the different treatments were added in sextuplicate and the plate was incubated at the same conditions for 72 h. Then, 0.25 mg mL^{-1} of methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, MO, USA) were added for 3 h. Media was removed and 200 μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, USA) was added and the plate was shaken at room temperature for 30 min to dissolve the formazan crystals [36]. Finally, the absorbance at 570 nm was measured on a Gen5[™] model microplate reader (BioTeK[®], Winooski, VT, USA).

2.8. Cell Cycle Analysis

Cells were seeded in six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after the treatment, they were harvested by trypsinization and fixed in cold ethanol (75%) for at least 30 min at -20 °C. Once the cells were fixed, they were pelleted, resuspended in 0.5 mL of Phosphate Buffered Saline (PBS) in the presence of 0.5% Triton X-100, 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of RNase A (Serva, Heidelberg, Germany), and 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of propidium iodide (Sigma Aldrich, MO, USA) and incubated for 30 min at room temperature in the dark. Finally, BD FACSCanto[™] flow cytometer (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA) was used to determine the distribution of the cells in the different phases of the cell cycle according to the DNA content.

2.9. Intracellular ROS Measurement

After the cell treatment, intracellular ROS generation was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) (Sigma-Aldrich, MO, USA), a fluorescence probe able to bind to free radicals. The test was carried out in an opaque 96-well plate (Sigma-Aldrich, MO, USA), and the probe was added at 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ during the time that ROS production was intended to be measured. After this time, the media was removed, and the plate was washed with PBS. Finally, the fluorescence was measured in a fluorescence plate reader POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) using excitation and emission wavelengths of 485 and 520 nm, respectively.

2.10. DNA Damage Measurement

Cells were seeded in six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the corresponding treatments were added. At the end of the treatment time, the phosphorylated form of the histone H2A.X was determined using the “Activation Dual Detection Kit” (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer’s instructions, and the Muse[®] Cell Analyzer (Millipore Corporation, Darmstadt, Germany).

2.11. Viability Assay

Cells were seeded in six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the corresponding treatments were added. At the end of the treatment time, the viability was determined using the “Count and Viability Kit” (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer’s instructions, and the Muse[®] Cell Analyzer (Millipore Corporation, Darmstadt, Germany).

2.12. Annexin V-PE Assay

Cells were seeded in six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, cells were treated 24 h with CLytA-DAAO and D-Alanine. At the end of the treatment, the apoptotic cell death was determined using the “Annexin V and Dead Cell Kit” (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), according to the manufacturer’s instructions, and the Muse[®] Cell Analyzer (Millipore Corporation, Darmstadt, Germany).

2.13. Lactate Dehydrogenase Assay Kit

Cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the corresponding treatments were added. At the end of the treatment, the extracellular lactate dehydrogenase (LDH) activity was determined using the “Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH)” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), according to the manufacturer’s instructions, and the absorbance at 492 nm was measured on a Gen5™ model microplate reader (BioTeK[®], Winooski, VT, USA).

2.14. Plasma Membrane Permeability

Cells were seeded in six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, after 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the treatment was added. After 6 h of treatment with CLytA-DAAO, the media was replaced by PBS with 15 µg mL⁻¹ of propidium iodide. The plate was kept in the dark for 30 min, and the labeled cells were photographed with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U) equipped with a digital camera (Nikon DS-1QM).

2.15. Statistical Analysis

The results are shown as the mean ± standard error of the mean (SEM) of at least three independent experiments. A descriptive statistic was performed with the GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, USA) calculating the mean, standard error of the mean, and standard deviation for the values. Shapiro Wilk statistical test was used to evaluate the normal distribution of the data, and to analyze the association between variables the Student’s *t* or Mann–Whitney U test were used. *p*-values lower than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. CLytA-DAAO Effect in Cell Lines of Different Origin

To determine the IC₅₀ of CLytA-DAAO in colon carcinoma, pancreatic adenocarcinoma and glioblastoma cell lines derived from primary cultures established in our laboratory, different

concentrations of CLytA-DAAO and 1 mM D-Alanine were tested in cell proliferation MTT assays. IC₅₀ values are shown in Table 1. Results in Figure 1A–C show that 2 U mL⁻¹ of CLytA-DAAO are enough to achieve the maximum CLytA-DAAO effect in all cell lines tested. We determined, as well, the optimal concentration of D-Alanine required to trigger the anti-proliferative effects of CLytA-DAAO in these cell lines. Figure 1D shows a representative result in SW-480 cell line, and we found that D-Alanine 1 mM is enough to reach the maximal effect of the enzyme.

Table 1. IC₅₀ values (U mL⁻¹) of free CLytA-D-amino acid oxidase (DAAO) with 1 mM D-Ala in different cell lines from colon carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, and glioblastoma treated for 72 h.

Type of Tumor	Cell Line	IC ₅₀ CLytA-DAAO (U mL ⁻¹)
Colon carcinoma	SW-480	0.18 ± 0.06
	SW-620	0.34 ± 0.04
	HT-29	1.3 ± 0.54
Pancreatic adenocarcinoma	IMIM-PC-2	0.13 ± 0.02
	RWP-1	0.23 ± 0.06
	Hs766T	0.11 ± 0.03
Glioblastoma	HGUE-GB-18	0.38 ± 0.14
	HGUE-GB-37	0.28 ± 0.09
	HGUE-GB-42	0.36 ± 0.11

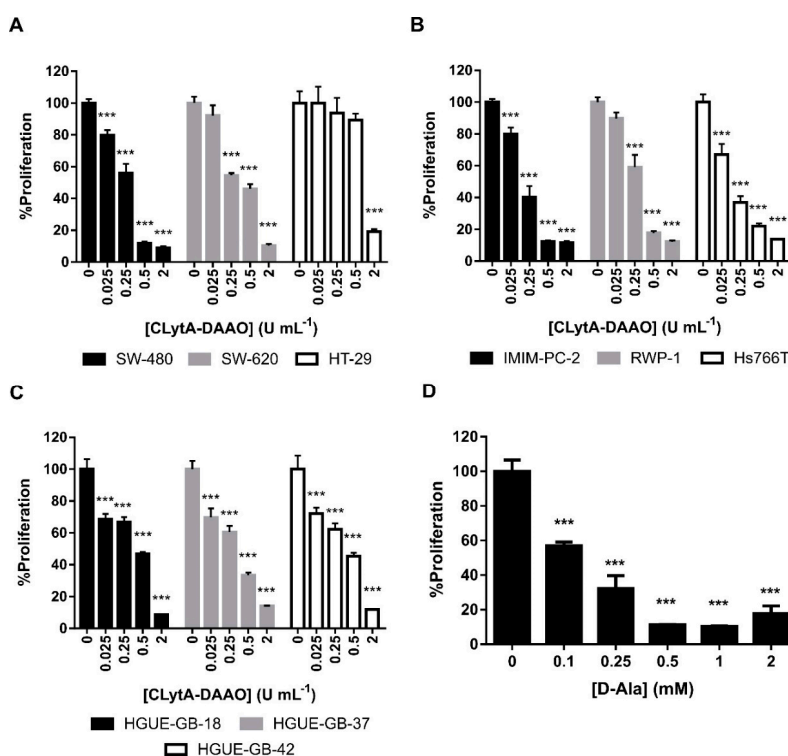


Figure 1. CLytA-DAAO effects on cell proliferation. (A) SW-480, SW-620, and HT-29 colon carcinoma cell lines, (B) IMIM-PC-2, RWP-1, and Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell lines, and (C) HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell lines were treated with 0.025–2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 72 h and cell proliferation was evaluated by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. (D) SW-480 colon carcinoma cell line was treated with 2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 0.1–2 mM D-Ala for 72 h and cell proliferation was evaluated by MTT assay. Data represent the mean ± SEM of the percentages of cells with respect to control, with n ≥ 6. *** p < 0.001.

In order to determine whether the effect of the CLytA-DAAO at 2 U mL^{-1} , with 1 mM D-Alanine , was cytotoxic or cytostatic we performed a cell cycle analysis after 24 h of treatment (Figure 2). We found that CLytA-DAAO, in the presence of D-Alanine, is able to induce cell death in almost all cell lines tested, with a lower effect in the colon carcinoma cell line HT-29 (Figure 2A), pancreatic adenocarcinoma cell line Hs766T (Figure 2B), and the glioblastoma cell line HGUE-GB-42 (Figure 2C).

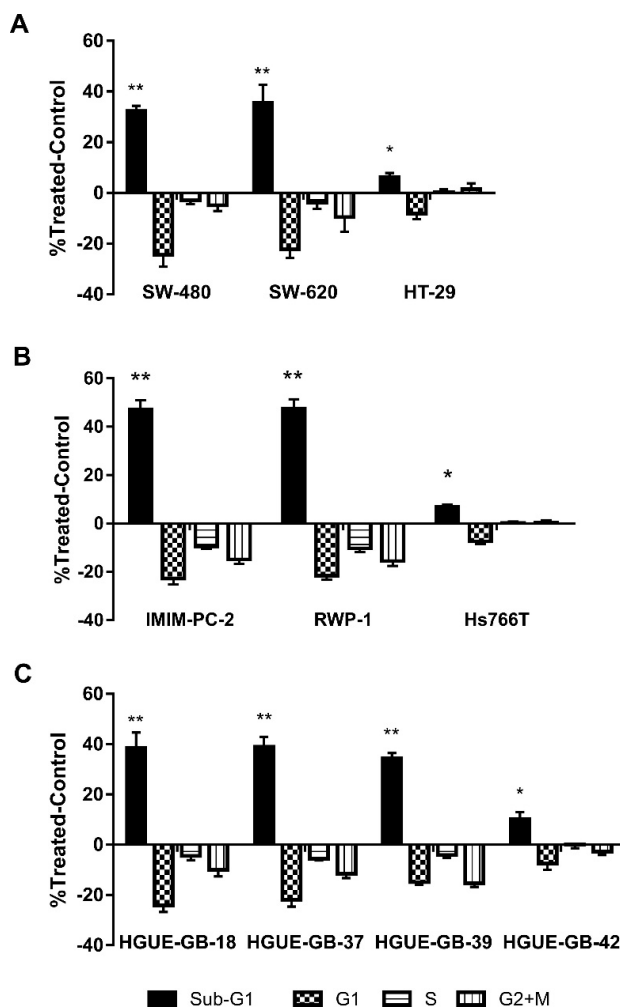


Figure 2. CLytA-DAAO effects on cell cycle. (A) SW-480, SW-620, and HT-29 colon carcinoma cell lines, (B) IMIM-PC-2, RWP-1, and Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell lines, and (C) HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell lines were treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Data represent the mean \pm SEM of changes in the percentage of cells in each phase of the cell cycle compared with the untreated control, with $n \geq 6$. * indicates $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

To determine the specificity of CLytA-DAAO treatment for tumoral cells, we determined CLytA-DAAO toxicity on non-tumor cell lines. We tested the CLytA-DAAO effect on lymphocytes primary cultures from non-oncological patients at HGUE, in mouse 3T3-L1 adipocytes, and in human non-tumoral cell lines from fibroblast (IMR90, 1BR3.G) and pancreas (HPDE). Results in Figure 3 show that CLytA-DAAO treatment only induced a minimal cell death in the IMR90 cells.

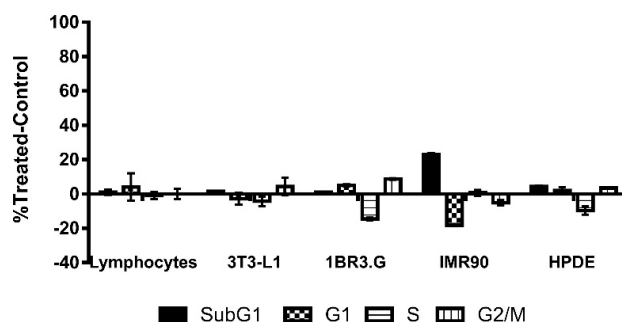


Figure 3. CLytA-DAAO effects on cell cycle distribution in non-tumor cell lines. Primary culture of lymphocytes, 3T3-L1 adipocytes, 1BR3.G, and IMR90 fibroblasts cell lines and HPDE human pancreatic cells were treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Data represent the mean \pm SEM of the percentages of treated cells minus those of the control untreated cells with $n \geq 3$.

3.2. CLytA-DAAO Effect as Free and Bound to MNPs

In order to use an enzymatic therapy against cancer, it could be necessary to immobilize the enzyme in a support that prevents its degradation by the organism and allows us to direct the enzyme towards the tumor. As previously mentioned, MNPs have been used for immobilization of the CLytA-DAAO chimera. To determine whether immobilized CLytA-DAAO was as effective as free CLytA-DAAO, a cell cycle analysis was performed after treating cell lines for 24 h. Figure 4 shows the percentage of cells in the subG1 phase after receiving the treatment. Our results show that bound CLytA-DAAO was significantly more effective inducing cell death than CLytA-DAAO free enzyme.

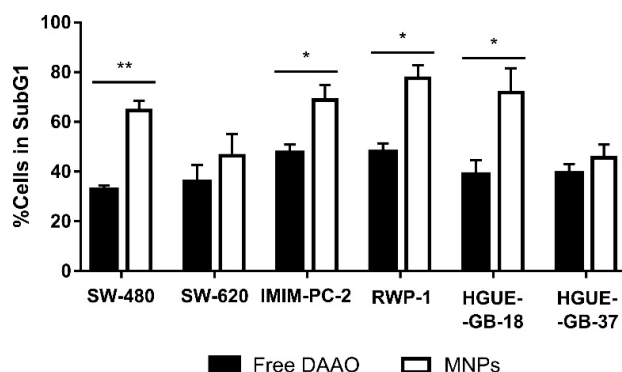


Figure 4. SW-480 and SW-620 colon carcinoma cell lines, IMIM-PC-2 and RWP-1 pancreatic adenocarcinoma cell lines, and HGUE-GB-18 and HGUE-GB-37 glioblastoma cell lines were treated with 2 U mL^{-1} free or bound to magnetic nanoparticles (MNPs) CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Data represent the mean \pm SEM of the percentages of treated cells in SubG1 phase minus those of the control cells with $n \geq 3$. * indicates $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

3.3. Mechanism of Action of CLytA-DAAO

In the chemical reaction catalyzed by the DAAO enzyme, H_2O_2 is produced, and this finally generates free radicals, able to induce DNA damage and cell death [37–39]. In order to test if this could be the mechanism involved in cell death, we determined the production of free radicals after CLytA-DAAO treatment in colon carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, and glioblastoma cell lines. Results in Figure 5A show that, in response to the enzymatic treatment, a rapid and sustained increase

in free radical production is observed in SW-480, IMIM-PC-2, and HGUE-GB-18. This result is extended to the rest of cell lines sensitive to cell death induced by CLytA-DAAO (data not shown). Next, we determined histone H2A.X activation in the same cell lines after the treatment with CLytA-DAAO, as this protein is phosphorylated in response to DNA damage. In Figure 5B, we observed an increase in histone H2A.X phosphorylation in all cell lines sensitive to cell death induction by CLytA-DAAO. Activation of histone H2A.X, clearly correlates with the increase in free radicals, thus the increase in ROS production is inducing DNA damage.

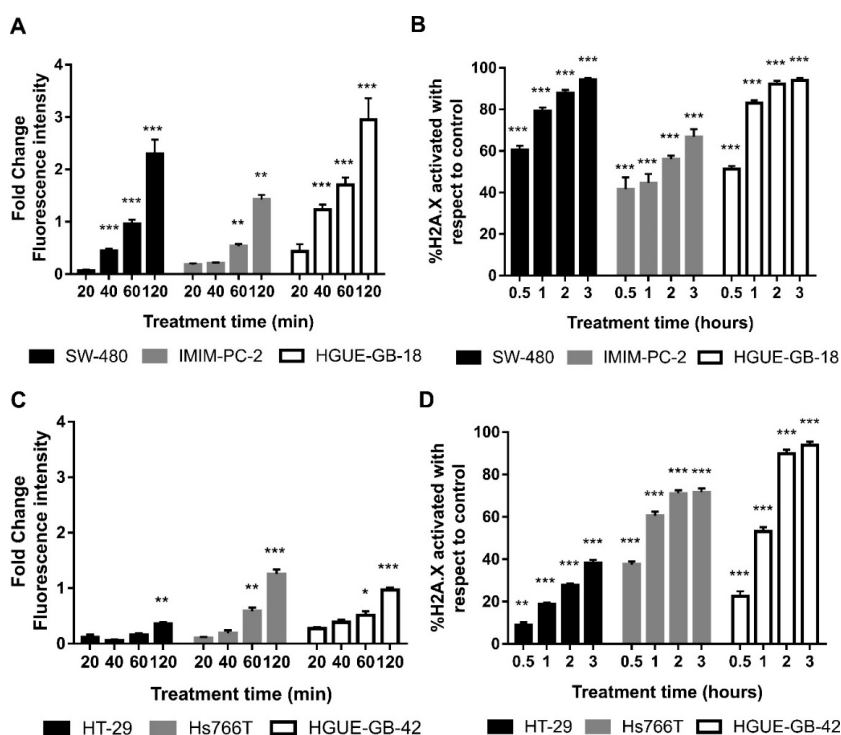


Figure 5. Oxidative damage induced by CLytA-DAAO. (A) SW-480 colon carcinoma cell line, IMIM-PC-2 pancreatic adenocarcinoma cell line, and HGUE-GB-18 glioblastoma cell line were treated with 2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 20, 40, 60, and 120 min. Then, free radical production was determined using 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCF-DA). Values represent the fold change of fluorescence intensity compared to control; (B) SW-480 colon carcinoma cell line, IMIM-PC-2 pancreatic adenocarcinoma cell line, and HGUE-GB-18 glioblastoma cell line were treated with 2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 0.5–3 h and then H2A.X phosphorylation was determined by flow cytometry. (C) HT-29 colon carcinoma cell line, Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell line, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell line were treated with 2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 20, 40, 60, and 120 min. Then, free radical production was determined using H₂DCF-DA. Values represent the fold change of fluorescence intensity compared to control; (D) HT-29 colon carcinoma cell line, Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell line, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell line were treated with 2 U mL⁻¹ CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 0.5–3 h and then H2A.X phosphorylation was determined by flow cytometry. Data represent the mean ± SEM of the percentage of cells, with $n \geq 3$. * indicates $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

We also wanted to study whether the resistance to cell death induced by CLytA-DAAO observed in HT-29, Hs766T, and HGUE-GB-42 cell lines, could be explained by a lower generation of ROS or a lower DNA damage. In order to answer this question, ROS production (Figure 5C) and histone H2A.X phosphorylation (Figure 5D) were studied in these cell lines. The results observed do not allow a single conclusion of why these cell lines are resistant to the cell death induced by CLytA-DAAO. In the case of

HT-29 colon carcinoma cell line, a lower production of free radicals and DNA damage can be observed in comparison with the sensitive cell lines. However, in Hs766T and HGUE-GB-42 cell lines, although free radicals do not increase as much as in sensitive cell lines, histone H2A.X phosphorylation reaches the levels observed in sensitive cell lines.

3.4. Mechanism of Cell Death Induced by CLytA-DAAO

In order to study whether CLytA-DAAO induced cell death was a caspase-dependent phenomenon, a pan-caspase inhibitor (Z-VAD) was used in combination with the treatment of CLytA-DAAO and D-Alanine. Figure 6A shows an example of this type of experiment in colon carcinoma (SW-620), pancreatic adenocarcinoma (IMIM-PC-2), and glioblastoma (HGUE-GB-37, HGUE-GB-39) cell lines. Our results indicate that only in glioblastoma, the Z-VAD was able to block cell death, this was also observed for all the other glioblastoma cellular models (data not shown). This result suggests that, in this type of tumor, CLytA-DAAO induces cell death through a caspase mediated apoptotic mechanism, while in colon and pancreatic cancer the cell death seems to be unrelated to the traditional apoptotic programmed cell death. To confirm the apoptotic cell death in glioblastoma, we carried out studies with Annexin V to determine whether phosphatidylserine externalization occurs. Figure 6B shows the percentage of cells treated with CLytA-DAAO and D-Alanine that were labeled with Annexin-PE but not with 7-AAD, that is, those that have externalized phosphatidylserine but whose membrane has not yet been affected. This result confirms that the cell death generated by CLytA-DAAO and D-Alanine in glioblastoma is apoptotic.

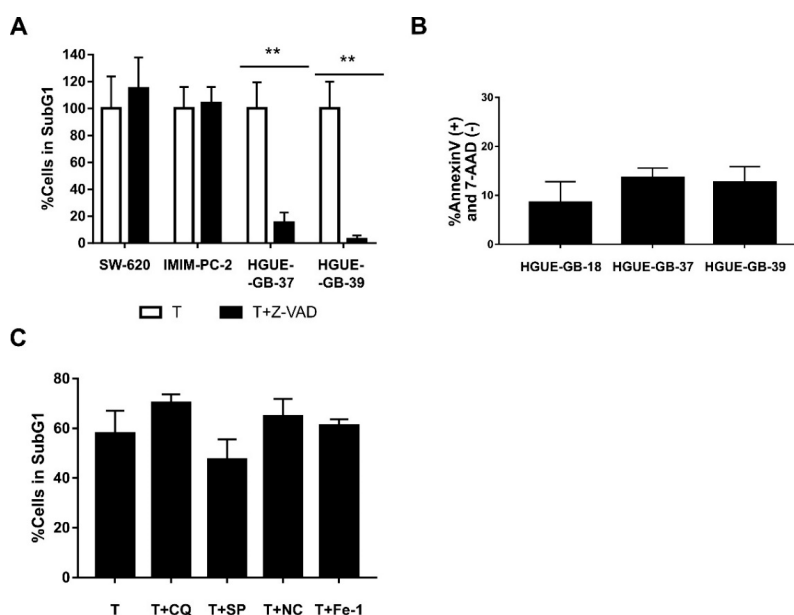


Figure 6. Type of cell death induced by CLytA-DAAO. (A) SW-620, IMIM-PC-2, HGUE-GB-37, and HGUE-GB-39 cell lines were treated with 2 U mL^{-1} free CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala in the presence or absence of $25 \text{ }\mu\text{M}$ Z-VAD for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. (B) HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines were treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala, for 24 h and apoptotic cell death was determined through Annexin V-PE (+) and 7-AAD (-) labeling by flow cytometry. (C) IMIM-PC-2 cell line was treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala in the presence or absence of $10 \text{ }\mu\text{M}$ chloroquine (CQ), $10 \text{ }\mu\text{M}$ spautine-1 (SP), $20 \text{ }\mu\text{M}$ necrostatine-1 (NC), and $10 \text{ }\mu\text{M}$ ferrostatin-1 for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Data represent the percentage of cells in sub-G1 phase, normalizing the treatment with CLytA-DAAO as $100\% \pm \text{SEM}$ with $n \geq 3$. ** indicates $p < 0.01$.

To check whether Bax is playing a role in CLytA-DAAO induced cell death, we used CLytA-DAAO and D-Alanine in combination with a Bax-inhibiting peptide in colon, pancreatic, and glioblastoma cell lines, only a 25% decrease in cell death in the HGUE-GB-37 glioblastoma cell line was observed (Figure S1). This result demonstrates that the apoptotic and non-apoptotic cell death caused by CLytA-DAAO is mostly independent of Bax.

Then, we evaluated whether other types of cell death inhibitors were able to inhibit CLytA-DAAO-induced cell death in colon and pancreatic carcinomas. Inhibitors against autophagic cell death, such as chloroquine or spautine-1, against necroptosis cell death, such as necrostatine-1, or against ferroptosis cell death, such as ferrostatine-1, were tested. In the Figure 6C, we show a representative result in the pancreatic adenocarcinoma cell line IMIM-PC-2, and we can observe that none of the inhibitors had a statistically significant effect on CLytA-DAAO-induced cell death. The same result was obtained in the rest of cell lines tested (data not shown).

Based on our previously shown results, we hypothesized that in pancreatic and colon carcinoma the death induced by CLytA-DAAO was a necrosis while in glioblastoma was a classic apoptosis. To test this hypothesis, we performed a released LDH activity test that is indicative of a necrotic cell death. In Figure 7, we compare CLytA-DAAO induced cell death (Figure 7A) with LDH extracellular activity (Figure 7B) in RWP-1 and IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell lines, SW-620 and SW-480 colon carcinoma cell lines, and HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines. Our results show that in pancreatic and colon carcinoma cell lines, LDH extracellular activity is detected, suggesting a necrotic type of cell death. Meanwhile, no LDH extracellular activity was detected in the glioblastoma cell lines, suggesting again that the cell death induced by the enzyme in glioblastoma is a classical apoptosis.

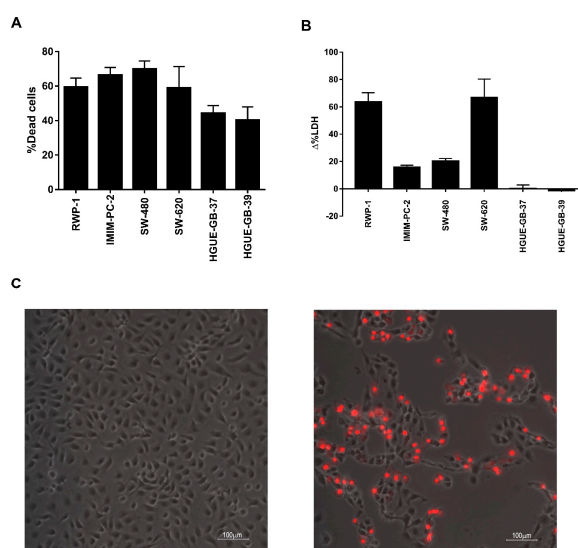


Figure 7. CLytA-DAAO plasmatic membrane rupture. (A) RWP-1 and IMIM-PC-2 pancreatic adenocarcinoma cell lines, SW-480 and SW-620 colon carcinoma cell lines, and HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines were treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala for 24 h and viability was determined by flow cytometry. Data represent the mean \pm SEM of the percentage of dead cells with respect to control, with $n \geq 3$. (B) RWP-1 and IMIM-PC-2 pancreatic adenocarcinoma cell lines, SW-480 and SW-620 colon carcinoma cell lines, and HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines were treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala for 24 h and extracellular LDH activity was measured. Data represent the mean \pm SEM of the percentage of change in extracellular detected LDH activity between the treated cells and the control untreated cells, with $n \geq 3$. (C) IMIM-PC-2 pancreatic adenocarcinoma cell line was treated with 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO, and 1 mM D-Ala for 6 h, and propidium iodide uptake was determined by microscopy. The left panel shows control cells and the right panel shows treated cells.

Next, we tested the plasmatic membrane integrity using a different approach. In this case, we added to cells propidium iodide, after being treated with CLytA-DAAO for 6 h. In Figure 7C, we show a representative result in the IMIM-PC-2 cell line, which indicates that the plasmatic membrane rupture takes place. The same result was obtained in the rest of colon and pancreatic carcinoma cell lines tested but not in glioblastoma cell lines (data not shown).

3.5. CLytA-DAAO as an Enhancer of Other Treatments

A possible use of CLytA-DAAO as enzymatic therapy is its combination with classic treatments used in clinical practice, with the aim to enhance their effect. In this study, we combined a low dose of CLytA-DAAO with TSA, a histone deacetylase inhibitor, with radiotherapy and with PARP inhibitors, which are related to DNA repair [40].

In order to verify whether we were able to potentiate the effect of TSA, we treated the cells with low doses of TSA and CLytA-DAAO either alone or in combination. In Figure 8A, we can observe the result obtained in the HGUE-GB-18 glioblastoma cell line. When we use low doses of TSA or CLytA-DAAO alone, we barely get 5% of cell death, however, when we combine both treatments, 20% of cell death is reached. This result was extended to the rest of the glioblastoma cell lines, although we did not observe potentiation in either pancreatic adenocarcinoma or colon carcinoma cell lines.

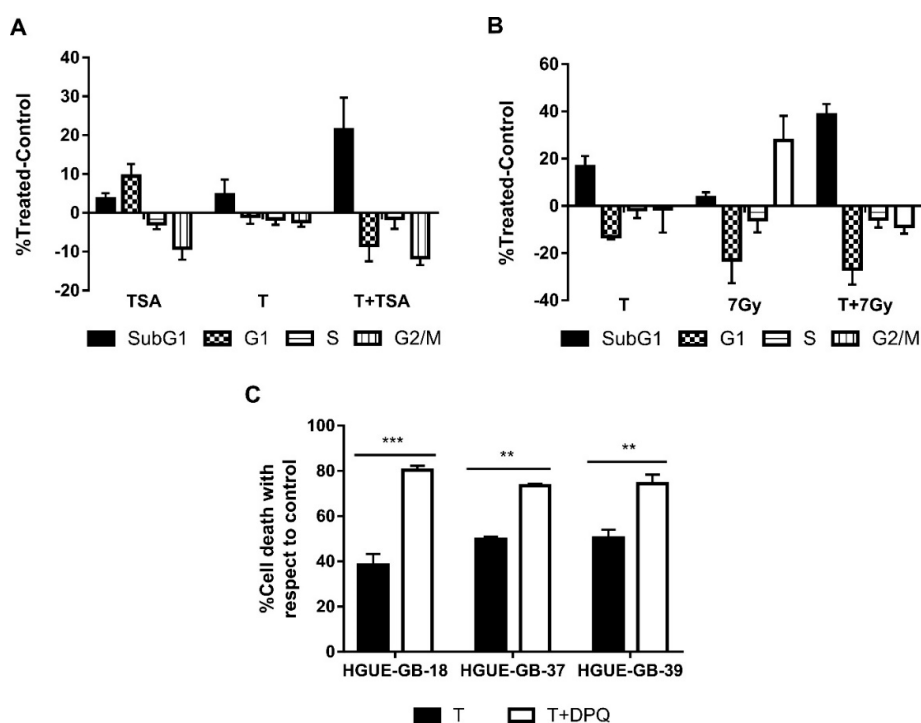


Figure 8. CLytA-DAAO as an enhancer of other treatments. (A) HGUE-GB-18 glioblastoma cell line was treated with 0.1 μM Trichostatin A (TSA) or 1 U mL^{-1} CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala or a combination of both treatments over 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. (B) RWP-1 pancreatic adenocarcinoma cell line was treated with 1 U mL^{-1} CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala or 7 Gy radiotherapy or a combination of both treatments for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. (C) HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines were treated with 10 μM DPQ or 2 U mL^{-1} CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala or a combination of both treatments over 24 h and viability was determined by flow cytometry. Data represent the mean \pm SEM of the percentages of cells with respect to control, with $n \geq 3$. ** indicates $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

We performed the same experiment using radiotherapy at a 7 Gy dose, in Figure 8B we can observe that in the RWP-1 cell line, cell death increases combining both treatments. In the case of radiotherapy, we observed potentiation in all cell lines of exocrine pancreatic carcinoma and glioblastoma [41] (data not shown).

Finally, as CLytA-DAAO generates DNA damage, we combined the treatment with CLytA-DAAO with DPQ, a PARP inhibitor. In Figure 8C, an enhancement of the CLytA-DAAO effect is observed when we combine the treatment with DPQ in glioblastoma cell lines. This result is not observed in the pancreatic or colon carcinoma cell lines (data not shown).

4. Discussion

In this article, we present data showing that an enzymatic therapy based on a CLytA-DAAO chimera constitutes a new therapeutic strategy for various types of tumors, so it can be used in colon carcinoma and, even more important, in pancreatic carcinoma and glioblastoma, two types of tumors for which there is no effective therapy to date.

Tumor cells are able to display several resistance mechanisms to the conventional therapies and, in many cases, the patients develop multiple resistance to drugs that are not related neither at the structural nor at the pharmacological level; this phenomenon is known as multidrug resistance (MDR) phenotype [42,43]. One strategy against chemotherapy resistance is the use of combination therapies with drugs not affected by the same resistance mechanism. The main problem of these combination therapies is how to administer them. In many cases, the different drugs cannot be administered simultaneously since the combination of their side effects could be very toxic for the patient [44,45].

It is generally accepted that if the anti-neoplastic drugs could be delivered and concentrated on the tumor, the side effects could decrease significantly [46,47]. Based on this, we can hypothesize that if the combination therapies are simultaneously delivered to the tumor, their side effects would decrease and, therefore, we would be able to use them at higher doses for systemic treatments. At this point, it could be even more interesting to concentrate inert compounds in the tumor and to turn them in situ in active drugs [4,5].

Initially, ROS-generating enzymes such as xanthine oxidase and glucose oxidase were used for such purposes [8]. However, the stability of these enzymes in vivo is low and their substrates (glucose, xanthine, and oxygen) are endogenous molecules whose concentration cannot be regulated. To overcome these limitations, the use of DAAO from *Rhodotorula gracilis* was proposed for cancer treatment [48].

On the other hand, another problem of cancer therapies is to ensure that the anti-neoplastic agents reach the tumor in an active form and at effective doses. The immobilization of DAAO in magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ functionalized with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) was previously tested. However, this type of nanoparticle is made by glutaraldehyde following a relatively complex procedure and shows cytotoxicity [49]. In this work, we developed a delivery system for DAAO based on MNPs. One of the advantages of our method is that the enzyme-nanoparticles binding is not covalent, so the immobilization process is easy and straightforward. This was accomplished through generation of a chimeric protein: CLytA-DAAO in which the CLytA domain confers a high choline binding affinity [27]. Based on this, we immobilized the chimeric enzyme to MNPs functionalized with DEAE, a chemical compound structurally similar to choline. This binding allows an additional advantage, as the enzyme can be easily released from the nanoparticles using choline, once the enzyme reaches its therapeutic target. Another advantage is that the negative effects can be controlled by the addition of the enzyme substrate, D-amino acids, which are not found in the human proteins. For this reason, the nanoparticles harboring CLytA-DAAO are inert until the substrate was added. This could be made once the nanoparticles had been delivered to the tumor through a magnetic field.

Our results show that CLytA-DAAO induces cell death in most of the cell lines tested (Figures 1 and 2), and the enzyme bound to nanoparticles is more efficient as anti-neoplastic agent than the free enzyme (Figure 4). It is known that the optimal temperature of CLytA-DAAO is close to 25 °C [50],

and one of the advantages of enzyme immobilization is the increase of their stability and their pH or temperature working-range [10,11]. Therefore, the reason why the enzyme is more efficient when it is immobilized is a higher biological stability of the enzyme at 37 °C (data not shown).

We also wondered about the putative CLytA-DAAO toxicity on non-tumor cells. It is known that, due to its accelerated metabolism, cancer cells show increased levels of ROS in comparison with non-tumoral cells, so that cancer cells are more sensitive to death generated by oxidative stress [3]. The results in Figure 3 show that CLytA-DAAO did not significantly affect either peripheral blood lymphocytes primary cultures from non-oncological patients, mouse adipocytes, or human cell lines from fibroblast and pancreas. Therefore, our data suggest that CLytA-DAAO has either no effect on non-tumor cells or a significantly lower effect than in tumor cells. Although the underlying reasons for this lack of CLytA-DAAO effect on non-tumor cells remain unknown, it may be due to the fact that non-tumor cells are not in constant division and their hereditary material is less exposed to the effect of ROS [51] and also, unlike most tumor cell lines, have a TP53 wild type that protects them from the genomic instability generated by ROS [52]. The lack of effect in non-tumoral cells is really important since the low toxicity together with the additional advantages of CLytA-DAAO such as enzyme stereospecificity which allows to control enzymatic induction, and the non-covalent affinity binding of CLytA-DAAO to MNPs which allows the release in situ, confer to this enzymatic therapy interesting properties for clinical use.

Cell death induction correlates with the production of free radicals (Figure 5A) and the increase of DNA damage (Figure 5B) in all cell lines sensitive to cell death induced by CLytA-DAAO. Thus, DNA damage could be the final effector of CLytA-DAAO-induced cell death. In this figure, we also compare the increase of free radicals (Figure 5C) and DNA damage (Figure 5D) between the cell lines resistant to cell death induced by CLytA-DAAO. It is important to point out that we are talking about resistance to cell death induction, because in Table 1 it is obvious that Hs766T and HGUE-GB-42 are sensitive to the antiproliferative effect of CLytA-DAAO. However, as shown in Figure 2, minimal induction of cell death is observed in these cell lines, suggesting that the antiproliferative CLytA-DAAO effect in these cell lines is mostly cytostatic. HT-29 resistance could be related to a lower production of free radicals, but in Hs766T and HGUE-GB-42 cell lines there are an increase in ROS production and an activation of H2A.X histone. The differences observed between resistant cell lines suggest the presence of different CLytA-DAAO-resistance mechanisms. The putative mechanism present in HT-29 cells could be more focused on cell detoxification preventing ROS generation, for these reason, HT-29 is also resistant to the cytostatic effect of CLytA-DAAO as shown in Table 1. On the other hand, we also observed that the HT-29 cell line has the mutation V600E in BRAF [53], unlike the rest of the cell lines tested. This mutation has been associated with a poor prognostic and a greater resistance to the common therapies [54,55]. Therefore, this mutation could be the reason for the lower effect of CLytA-DAAO in this cell line. However, in Hs766T cells, the resistance mechanism could be based on the repair of DNA damage or the blockade of the mechanisms involved in DNA damage-induced cell death. It is interesting to mention that Hs766T cell line is quite resistant to several treatments, such as gemcitabine and others [56], and that this cell line has a wild type TP53 meanwhile IMIM-PC-2 and RWP-1 have mutant TP53. TP53 is crucial in the cellular response to agents that induce DNA damage [57,58]. In addition, it has been found that Hs766T cells have a mitotic defective checkpoint [59]. We know that initially CLytA-DAAO blocks the cell cycle in G2+M phase and then, these cells are committed to cell death (data not shown). Therefore, it could be that the incapacity of Hs766T cells to get blocked in G2+M is protecting them of the CLytA-DAAO induced cell death.

Results observed in Figure 5 raised the question of whether there is a universal molecular mechanism for CLytA-DAAO-induced cell death. To determine this, we treated different cell lines with CLytA-DAAO and D-Alanine either alone or combined with different cell death inhibitors, such as chloroquine or spautine-1 against autophagy, necrostatine-1 against necroptosis, ferrostatin-1 against ferroptosis, and a pan-caspase inhibitor, Z-VAD, against apoptosis. In colon and pancreas cancer cell lines, no inhibitor was able to block CLytA-DAAO-induced cell death (Figure 6A). Instead, we

observed that Z-VAD is able to significantly block CLytA-DAAO-induced cell death in glioblastoma cell lines (Figure 6B). Consequently, in this type of tumor, CLytA-DAAO-induced cell death could be, at least in part, due to a classical apoptotic mechanism [60]. As a consequence, we thought that the cell death induced by CLytA-DAAO in colon and pancreas cell lines could be due to a necrotic mechanism. To verify this, we studied whether plasma membrane rupture occurred after treating the cells with CLytA-DAAO, and we observed that indeed, in the colon and pancreas carcinoma cell lines the plasma membrane rupture took place, but this did not occur in the glioblastoma cell lines (Figure 7).

We also considered whether we could use the treatment with CLytA-DAAO as an enhancer of other treatments. TSA is an histone deacetylase (HDAC) inhibitor and therefore contributes to chromatin decompaction [61], thereby DNA would be more exposed to the effect of ROS and it is possible that the combination of low doses of TSA and CLytA-DAAO could have an enhanced effect. The result observed in Figure 8A confirmed our hypothesis in some cell models. On the other hand, one of the most commonly used therapies against cancer is radiotherapy. Radiotherapy generates DNA damage directly, due to ionizing radiation, and indirectly through the generation of ROS [62,63]. Since the cell death generated by CLytA-DAAO is due to the increase of ROS, we thought that we might be able to enhance the effect of radiotherapy using low doses of CLytA-DAAO. Results in Figure 8B show that it is possible to use CLytA-DAAO to enhance the radiotherapy effect. Since CLytA-DAAO causes the cell death through the generation of DNA damage, another option was to block DNA repair. To do this, we used DPQ, an inhibitor of PARP, in combination with CLytA-DAAO and D-Alanine. Again, we obtained a potentiation of cell death, although this result was only observed in glioblastoma cell lines (Figure 8C). It is important to point out that a recent report has shown that Olaparib, a PARP inhibitor, constitutes a useful therapy for a subset of pancreatic adenocarcinoma patients (8–9% of total patients), which show BRCA 1 and 2 alterations [64]. It is tempting to hypothesize that CLytA-DAAO could potentiate the Olaparib effect in such patients, however, neither IMIM-PC-2, RWP-1, nor Hs766T have been shown defective in BRCA 1 or 2.

Our results constitute a proof of concept suggesting that an enzymatic therapy based on MNPs-immobilized CLytA-DAAO could constitute a useful therapy in colon and pancreatic carcinoma as well as glioblastoma. Besides, it could be used as monotherapy and in combination with epigenetic and radiotherapy therapy and DNA repair base therapy. Besides, the advantages of these nanoparticles with respect to those previously used are that they do not show cytotoxicity, allowing tumor localization and low risk of side effects [65]. Then, antitumor activity could be triggered by the addition of a D-amino acid. Another advantage of our system is that the immobilization of the enzyme is not a covalent bond, so a controlled release of CLytA-DAAO from the nanoparticles is possible, once located on the tumor.

5. Conclusions

- A chimeric enzyme was built adding the CLytA domain to the D-amino acid oxidase (CLytA-DAAO) to allow its non-covalent binding to DEAE functionalized magnetic nanoparticles (MNPs).
- Free and immobilized CLytA-DAAO, in the presence of a D-amino acid, induce cell death in colon carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, and glioblastoma cell lines.
- Non-tumoral cell models are not induced to death by the CLytA-DAAO chimera.
- CLytA-DAAO-induced cell death is caused by DNA damaged provoked by the increase of ROS.
- CLytA-DAAO-induced cell death in colon and pancreas carcinoma cell lines is a necrosis meanwhile that in glioblastoma cell lines is an apoptotic cell death.
- The therapy with CLytA-DAAO and D-Alanine can be used per se or as an enhancer of other treatments related to the generation of ROS or DNA damage, such as epigenetic inhibition of histone deacetylase, radiotherapy, and DNA repair inhibition.
- Our results show that treatment with CLytA-DAAO alone or in combination with other drugs may constitute a valid therapeutic alternative for poor prognosis tumors, such as exocrine pancreatic carcinomas and glioblastomas.

- We found three cell lines resistant to cell death induced by CLytA-DAAO: HT-29 colon carcinoma cell line, Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell line, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell line.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2218-273X/10/2/222/s1>, Figure S1: IMIM-PC-2, SW-480, HGUE-GB-18 and HGUE-GB-37 cells were treated with 2 U mL⁻¹ free CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala in the presence or absence of 200 μM of Bax-inhibiting peptide, V5 (BIP). Then, viability was determined by flow cytometry analysis. Data represents the percentage of CLytA-DAAO induced cell death in the presence of BIP taking the CLytA-DAAO induced cell death in the absence of BIP as the 100%. Data are presented as mean ± SEM with $n \geq 3$. * indicates $p < 0.05$.

Author Contributions: M.S. and J.M.S. participated in conceptualization, funding acquisition, supervision, and project administration. M.F.-B., D.B.-G., M.P.V. and E.P.-V. participated in investigation and methodology. M.F.-B., P.G.-M., B.M., C.A., V.M.B., and M.S. participated in validation and formal analysis of data presented in this article. M.F.-B. and M.S. participated in writing the original draft. Finally, P.G.-M., B.M., C.A., V.M.B., J.M.S., and M.S. participated in reviewing and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Spanish Instituto de Salud Carlos III, grant number PI01202025, and donations from Association of women affected by breast cancer in Elche and the region (AMACMEC) to MS and grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, grant numbers BIO2013-47684-R and BIO2016-79323-R, and the RETICS-FEDER RICET, RD16/0027/0010, to JMS. The CIBER of Enfermedades Respiratorias (CIBERES) is an initiative of the Spanish Instituto de Salud Carlos III and Spanish National Research Council (CSIC Grant 2018201132).

Acknowledgments: The authors are grateful to Mrs. Mónica López Sarrio for her support in the artistic work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Siegel, R.; Ma, J.; Zou, Z.; Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J. Clin.* **2014**, *64*, 9–29. [[CrossRef](#)]
2. Fang, J.; Nakamura, H.; Iyer, A.K. Tumor-targeted induction of oxystress for cancer therapy. *J. Drug Target.* **2007**, *15*, 475–486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Nogueira, V.; Hay, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 4309–4314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C.J. Introduction to the Background, Principles, and State of the Art in Suicide Gene Therapy. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 071–088. [[CrossRef](#)]
5. Greco, O.; Dachs, G.U. Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: Historical appraisal and future perspectives. *J. Cell. Physiol.* **2001**, *187*, 22–36. [[CrossRef](#)]
6. Pollegioni, L.; Sacchi, S.; Caldinelli, L.; Boselli, A.; Pilone, M.S.; Piubelli, L.; Molla, G. Engineering the properties of D-amino acid oxidases by a rational and a directed evolution approach. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2007**, *8*, 600–618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M.S.; Molla, G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1373–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Ben-Yoseph, O.; Ross, B.D. Oxidation therapy: The use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment. *Br. J. Cancer* **1994**, *70*, 1131–1135. [[CrossRef](#)]
9. Yoshikawa, T.; Kokura, S.; Tainaka, K.; Naito, Y.; Kondo, M. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1617–1620.
10. Ding, S.; Cargill, A.A.; Medintz, I.L.; Claussen, J.C. Increasing the activity of immobilized enzymes with nanoparticle conjugation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2015**, *34*, 242–250. [[CrossRef](#)]
11. Mohamed, H.; Ahmed, O. Methods of Enzyme Immobilization. *Int. J. Curr. Pharm. Rev. Res.* **2016**, *7*, 385–392.
12. Liu, D.-M.; Chen, J.; Shi, Y.-P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *102*, 332–342. [[CrossRef](#)]
13. Bilal, M.; Zhao, Y.; Rasheed, T.; Iqbal, H.M.N. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *120*, 2530–2544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Xie, T.; Wang, A.; Huang, L.; Li, H.; Chen, Z.; Wang, Q.; Yin, X. Recent advance in the support and technology used in enzyme immobilization. *Afr. J. Biotechnol.* **2009**, *8*, 4724–4733.

15. López, R.; García, E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 553–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Caubín, J.; Martín, H.; Roa, A.; Cosano, I.; Pozuelo, M.; de La Fuente, J.M.; Sánchez-Puelles, J.M.; Molina, M.; Nombela, C. Choline-binding domain as a novel affinity tag for purification of fusion proteins produced in *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, *74*, 164–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Maestro, B.; Velasco, I.; Castillejo, I.; Arévalo-Rodríguez, M.; Cebolla, A.; Sanz, J.M. Affinity partitioning of proteins tagged with choline-binding modules in aqueous two-phase systems. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1208*, 189–196. [[CrossRef](#)]
18. Bello-Gil, D.; Maestro, B.; Fonseca, J.; Feliu, J.M.; Climent, V.; Sanz, J.M. Specific and reversible immobilization of proteins tagged to the affinity polypeptide C-LyTA on functionalized graphite electrodes. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87995. [[CrossRef](#)]
19. Castro-Galache, M.D.; Ferragut, J.A.; Barbera, V.M.; Martín-Orozco, E.; Gonzalez-Ros, J.M.; Garcia-Morales, P.; Saceda, M. Susceptibility of multidrug resistance tumor cells to apoptosis induction by histone deacetylase inhibitors. *Int. J. Cancer* **2003**, *104*, 579–586. [[CrossRef](#)]
20. Garcia-Morales, P.; Gómez-Martínez, A.; Carrato, A.; Martínez-Lacaci, I.; Barberá, V.M.; Soto, J.L.; Carrasco-García, E.; Menéndez-Gutiérrez, M.P.; Castro-Galache, M.D.; Ferragut, J.A.; et al. Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines. *Mol. Cancer* **2005**, *4*, 1222–1230. [[CrossRef](#)]
21. García-Morales, P.; Carrasco-García, E.; Ruiz-Rico, P.; Martínez-Mira, R.; Menéndez-Gutiérrez, M.P.; Ferragut, J.A.; Saceda, M.; Martínez-Lacaci, I. Inhibition of Hsp90 function by ansamycins causes downregulation of cdc2 and cdc25c and G2/M arrest in glioblastoma cell lines. *Oncogene* **2007**, *26*, 7185–7193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Carrasco-García, E.; Martínez-Lacaci, I.; Mayor-López, L.; Tristante, E.; Carballo-Santana, M.; García-Morales, P.; Ventero Martín, M.; Fuentes-Baile, M.; Rodríguez-Lescure, Á.; Saceda, M. PDGFR and IGF-1R Inhibitors Induce a G2/M Arrest and Subsequent Cell Death in Human Glioblastoma Cell Lines. *Cells* **2018**, *7*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Grasso, S.; Tristante, E.; Saceda, M.; Carbonell, P.; Mayor-López, L.; Carballo-Santana, M.; Carrasco-García, E.; Rocamora-Reverte, L.; García-Morales, P.; Carballo, F.; et al. Resistance to Selumetinib (AZD6244) in colorectal cancer cell lines is mediated by p70S6K and RPS6 activation. *Neoplasia* **2014**, *16*, 845–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ventero, M.P.; Fuentes-Baile, M.; Quereda, C.; Perez-Valeciano, E.; Alenda, C.; Garcia-Morales, P.; Esposito, D.; Dorado, P.; Manuel Barbera, V.; Saceda, M. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212581. [[CrossRef](#)]
25. Herranz-López, M.; Fernández-Arroyo, S.; Pérez-Sánchez, A.; Barrajón-Catalán, E.; Beltrán-Debón, R.; Menéndez, J.A.; Alonso-Villaverde, C.; Segura-Carretero, A.; Joven, J.; Micol, V. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 253–261. [[CrossRef](#)]
26. Ouyang, H.; Mou, L.; Luk, C.; Liu, N.; Karaskova, J.; Squire, J.; Tsao, M.S. Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am. J. Pathol.* **2000**, *157*, 1623–1631. [[CrossRef](#)]
27. Sanchez-Puelles, J.M.; Sanz, J.M.; Garcia, J.L.; Garcia, E. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 153–159. [[CrossRef](#)]
28. Brent, R.; Ptashne, M. Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 4204–4208. [[CrossRef](#)]
29. Moldes Tabarés, C. Desarrollo de Nuevos Sistemas para la Producción de Proteínas de Fusión por Fermentación. Ph.D. Thesis, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 2003.
30. Lederberg, E.M.; Cohen, S.N. Transformation of *Salmonella typhimurium* by plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **1974**, *119*, 1072–1074. [[CrossRef](#)]
31. Sambrook, J.; Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001; ISBN 0879695773.
32. Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680–685. [[CrossRef](#)]
33. Pollegioni, L.; Piloni, M.S. Purification of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase. *Protein Expr. Purif.* **1992**, *3*, 165–167. [[CrossRef](#)]

34. Fonda, M.L.; Anderson, B.M. D-amino acid oxidase. I. Spectrophotometric studies. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 3957–3962. [[PubMed](#)]
35. Molla, G.; Vegezzi, C.; Pilone, M.S.; Pollegioni, L. Overexpression in *Escherichia coli* of a Recombinant Chimeric *Rhodotorula gracilis* d-Amino Acid Oxidase. *Protein Expr. Purif.* **1998**, *14*, 289–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55–63. [[CrossRef](#)]
37. Stoian, I.; Oros, A.; Moldoveanu, E. Apoptosis and free radicals. *Biochem. Mol. Med.* **1996**, *59*, 93–97. [[CrossRef](#)]
38. Beckman, K.B.; Ames, B.N. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19633–19636. [[CrossRef](#)]
39. Jacobson, M.D. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 83–86. [[CrossRef](#)]
40. Beck, C.; Robert, I.; Reina-San-Martin, B.; Schreiber, V.; Dantzer, F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: Focus on PARP1, PARP2 and PARP3. *Exp. Cell Res.* **2014**, *329*, 18–25. [[CrossRef](#)]
41. Esposito, R.D.; Planes Meseguer, D.; Dorado Rodríguez, P.; Barberá, V.M.; Saceda, M.; Fernandez Fornos, L. Empowering radiation therapy effect through a nanotechnology based enzymatic therapy. *Phys. Med.* **2016**, *32*, 251. [[CrossRef](#)]
42. Tan, B.; Piwnica-Worms, D.; Ratner, L. Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr. Opin. Oncol.* **2000**, *12*, 450–458. [[CrossRef](#)]
43. Ford, J.M.; Hait, W.N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer. *Pharm. Rev.* **1990**, *42*, 155–199. [[PubMed](#)]
44. Park, S.R.; Davis, M.; Doroshow, J.H.; Kummer, S. Safety and feasibility of targeted agent combinations in solid tumours. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2013**, *10*, 154–168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Soria, J.-C.; Massard, C.; Izzedine, H. From Theoretical Synergy to Clinical Supra-Additive Toxicity. *J. Clin. Oncol.* **2009**, *27*, 1359–1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Davis, M.E.; Chen, Z.; Shin, D.M. Nanoparticle therapeutics: An emerging treatment modality for cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 771–782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cattaneo, A.G.; Gornati, R.; Sabbioni, E.; Chiriva-Internati, M.; Cobos, E.; Jenkins, M.R.; Bernardini, G. Nanotechnology and human health: Risks and benefits. *J. Appl. Toxicol.* **2010**, *30*, 730–744. [[CrossRef](#)]
48. Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Pilone, M.S.; Ross, B.D. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: A cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene* **1998**, *9*, 185–193. [[CrossRef](#)]
49. Bava, A.; Gornati, R.; Cappellini, F.; Caldinelli, L.; Pollegioni, L.; Bernardini, G. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: A potential novel approach for cancer enzymatic therapy. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1797–1806. [[CrossRef](#)]
50. Bello-Gil, D. Desarrollo de Sistemas para la Inmovilización de Proteínas y sus Aplicaciones Biotecnológicas. Ph.D. Thesis, Universidad Miguel Hernández de Elche, Elche, Spain, 2013.
51. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
52. Williams, A.B.; Schumacher, B. p53 in the DNA-Damage-Repair Process. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2016**, *6*, a026070. [[CrossRef](#)]
53. Wu, Z.; Huang, M.; Gong, Y.; Lin, C.; Guo, W. BRAF and EGFR inhibitors synergize to increase cytotoxic effects and decrease stem cell capacities in BRAF(V600E)-mutant colorectal cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* **2018**, *50*, 355–361. [[CrossRef](#)]
54. Nakaji, Y.; Oki, E.; Nakanishi, R.; Ando, K.; Sugiyama, M.; Nakashima, Y.; Yamashita, N.; Saeki, H.; Oda, Y.; Maehara, Y. Prognostic value of BRAF V600E mutation and microsatellite instability in Japanese patients with sporadic colorectal cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2016**, *143*, 151–160. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Spagnoletti, G.; Li Bergolis, V.; Piscazzi, A.; Giannelli, F.; Condelli, V.; Sisinni, L.; Bove, G.; Storto, G.; Landriscina, M. Cyclin-dependent kinase 1 targeting improves sensitivity to radiation in BRAF V600E colorectal carcinoma cells. *Tumor Biol.* **2018**, *40*, 1010428318770957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Fournier, K.F.; Wang, H.; Marquis, L.; Abbruzzese, J.L.; Gallick, G.E.; Logsdon, C.D.; McConkey, D.J.; Choi, W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5820–5828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **2000**, *408*, 307–310. [[CrossRef](#)]

58. Kruiswijk, F.; Labuschagne, C.F.; Vousden, K.H. p53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 393–405. [[CrossRef](#)]
59. Hempen, P.M.; Kurpad, H.; Calhoun, E.S.; Abraham, S.; Kern, S.E. A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 445. [[CrossRef](#)]
60. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [[CrossRef](#)]
61. Roche, J.; Bertrand, P. Inside HDACs with more selective HDAC inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 451–483. [[CrossRef](#)]
62. Riley, P.A. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **1994**, *65*, 27–33. [[CrossRef](#)]
63. Schae, D.; McBride, W.H. Opportunities and challenges of radiotherapy for treating cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 527–540. [[CrossRef](#)]
64. Golan, T.; Hammel, P.; Reni, M.; Van Cutsem, E.; Macarulla, T.; Hall, M.J.; Park, J.-O.; Hochhauser, D.; Arnold, D.; Oh, D.-Y.; et al. Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 317–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Mejías, R.; Pérez-Yagüe, S.; Gutiérrez, L.; Cabrera, L.I.; Spada, R.; Acedo, P.; Serna, C.J.; Lázaro, F.J.; Villanueva, A.; Morales, M.D.P.; et al. Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy. *Biomaterials* **2011**, *32*, 2938–2952. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Cell Death Mechanisms Induced by CLytA-DAAO Chimeric Enzyme in Human Tumor Cell Lines

María Fuentes-Baile ¹, Pilar García-Morales ², Elizabeth Pérez-Valenciano ²,
María P. Ventero ³, Jesús M. Sanz ⁴, Camino de Juan Romero ^{1,2}, Víctor M. Barberá ^{1,5},
Cristina Alenda ³ and Miguel Saceda ^{1,2,*}

- ¹ Unidad de Investigación, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Hospital General Universitario de Elche, Camí de l'Almazara, 11, 03203 Elche (Alicante), Spain; mariafuentesbaile@gmail.com (M.F.-B.); camino.dejuan@gmail.com (C.d.J.R.); barbera_vicjua@gva.es (V.M.B.)
 - ² Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avda. Universidad s/n, Ed. Torregaitán, 03202 Elche (Alicante), Spain; pgarcia@umh.es (P.G.-M.); elizabethpv2908@gmail.com (E.P.-V.)
 - ³ Unidad de Investigación, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Hospital General Universitario de Alicante, C/Maestro Alonso, 10, 03010 Alicante, Spain; maripazvm@gmail.com (M.P.V.); alenda.cris@gmail.com (C.A.)
 - ⁴ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), C/Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain; jmsanz@cib.csic.es
 - ⁵ Unidad de Genética Molecular, Hospital General Universitario de Elche, Camí de l'Almazara, 11, 03203 Elche (Alicante), Spain
- * Correspondence: msaceda@umh.es; Tel.: +34-966658432

Received: 20 October 2020; Accepted: 10 November 2020; Published: 12 November 2020



Abstract: The combination of the choline binding domain of the amidase N-acetylmuramoyl-L-alanine (CLytA)-D-amino acid oxidase (DAAO) (CLytA-DAAO) and D-Alanine induces cell death in several pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines. In glioblastoma cell lines, CLytA-DAAO-induced cell death was inhibited by a pan-caspase inhibitor, suggesting a classical apoptotic cell death. Meanwhile, the cell death induced in pancreatic and colon carcinoma cell lines is some type of programmed necrosis. In this article, we studied the mechanisms that trigger CLytA-DAAO-induced cell death in pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines and we acquire a further insight into the necrotic cell death induced in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. We have analyzed the intracellular calcium mobilization, mitochondrial membrane potential, PARP-1 participation and AIF translocation. Although the mitochondrial membrane depolarization plays a crucial role, our results suggest that CLytA-DAAO-induced cell death is context dependent. We have previously detected pancreatic and colorectal carcinoma cell lines (Hs766T and HT-29, respectively) that were resistant to CLytA-DAAO-induced cell death. In this study, we have examined the putative mechanism underlying the resistance in these cell lines, evaluating both detoxification mechanisms and the inflammatory and survival responses. Overall, our results provide a better understanding on the cell death mechanism induced by CLytA-DAAO, a promising therapy against cancer.

Keywords: cancer therapy; reactive oxygen species; oxidative damage; mitochondrial membrane potential; calcium mobilization; PARP-1; AIF; apoptosis; necrotic-like cell death

1. Introduction

Cell death is a necessary phenomenon for the normal development of vertebrate and invertebrate organisms. Through this process, organisms discard damaged cells in pathological conditions such as ischemic diseases, viral infections and radiation damage, among others. A few years ago, it was only possible to differentiate between two forms of death: apoptosis and necrosis [1]. In recent years, researchers have extensively studied the different mechanisms by which cells die in response to different stimuli [2–4] allowing the development of a wide range of well-characterized cell death mechanisms. The main forms of cell death have been divided into subclasses, as variations in the mechanism have been described, providing a better understanding of how this phenomenon works. Although all forms of cell death have different morphological and molecular characteristics, they are closely related and, in many cases, interconnected.

The combination of resistance to programmed cell death and genetic instability, two hallmarks of tumor cells, often leads to chemo- and radio-resistance [5]. Therefore, acquiring insights into cell death and drug resistance mechanisms is crucial for the development of effective treatments against cancer.

A growing strategy for cancer treatment is the so called suicide therapy, which consists of the use of genes or enzymes that transform a non-toxic prodrug in a toxic compound causing tumor cell death [6]. Delivering these enzymes, which are harmless by themselves, specifically to the tumor area, increases effectiveness and abolishes secondary effects related to classical anticancer therapies [7]. Recently, we have evaluated the effect of the D-amino acid oxidase (DAAO) protein from *Rhodotorula gracilis*, which catalyzes the oxidation of D-amino acids and generates hydrogen peroxide as a by-product in tumor cell lines [8]. Furthermore, we use a chimera formed by the DAAO enzyme bound to the choline-binding domain of the amidase N-acetylmuramoyl-L-alanine (CLytA) from *Streptococcus pneumoniae* [9]. Thus, the CLytA-DAAO chimeric protein can be immobilized on nanoparticles that contain choline or analogues such as diethylaminoethanol (DEAE) on their surface which opens the possibility of converting DAAO treatment in targeted therapy [10].

The combination of CLytA-DAAO with D-Ala, either free or immobilized in magnetic nanoparticles, induces cell death on several pancreatic and colorectal carcinomas and in glioblastoma cell lines [11]. CLytA-DAAO generates oxidative stress, causing irreparable DNA damage and ultimately leading to cell death. The blockade of CLytA-DAAO-induced cell death by a pan-caspase inhibitor in glioblastoma cell lines suggests that a classical apoptosis mechanism occurs. However, the cell death induced by the same treatment in the rest of pancreatic and colorectal carcinoma cell lines was not inhibited by caspase inhibitors, necrostatin-1, chloroquine, spautine-1 or ferrostatin-1 [11]. In this way, other forms of cell death such as necroptosis, autophagy and ferroptosis were discarded as mechanisms implicated in this process. Accordingly, a putative mechanism was proposed regarding pancreatic and colorectal carcinoma cell lines—i.e., that CLytA-DAAO induces a necrotic-like cell death.

Our laboratory has identified several cell lines totally or partially resistant to CLytA-DAAO-induced cell death. These cell lines presented different profiles in terms of free radical generation and DNA damage, indicating the existence of different resistance mechanisms. In some cell lines, the resistance mechanisms appear to be related to the detoxification of free radicals generated by the CLytA-DAAO-catalyzed reaction, while in others it would depend on signaling pathways related to cell survival and damage repair [11].

In the current study, we tested parthanatos as a possible mechanism involved in the cell death induced by CLytA-DAAO in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. Parthanatos is well-defined as a necrosis-like cell death that occurs when there is excessive DNA damage and has been widely associated with drugs that generate oxidative stress [12,13]. This form of cell death is characterized by the overexpression of Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1), the cytosolic accumulation of polymeric PAR, the translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) from the mitochondria to the nucleus, the mobilization of intracellular calcium and the depolarization of the mitochondrial membrane [14].

We found that CLytA-DAAO induces apoptotic and different types of mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis (due to the opening of permeability transition pores in the mitochondria) and even parthanatos cell death, depending on the cellular context. These data together with the lack of effect in non-tumoral cells, that we have previously described [11], suggest that CLytA-DAAO treatment could be widely use.

Finally, we have analyzed the resistance mechanisms against CLytA-DAAO-induced cell death that are present in Hs766T, a pancreatic carcinoma cell line, and in HT-29, a colorectal carcinoma cell line. We have described the role in this process of several genes and transcription factors involved in the inflammatory response, cell survival and detoxification. Our results suggest that the resistance mechanisms are pleiotropic in all the cell lines tested, although we have identified several common interrelated signaling pathways that allow these cell lines to avoid CLytA-DAAO-induced cell death.

2. Results

2.1. Calcium Release from Cellular Reservoirs Is Responsible for the MMP Decrease That Leads to Cell Death in Most of the Cell Lines after CLytA-DAAO Treatment

In order to gain insights into the mechanism of CLytA-DAAO-induced cell death, we analyzed the mitochondrial membrane potential (MMP) after CLytA-DAAO treatment. Mitochondrial membrane depolarization was found in all cell lines tested during the first hours of treatment with CLytA-DAAO (Figure 1A).

To examine whether the entry of calcium into the mitochondria could be responsible for an MMP decrease, we analyzed the role of calcium in CLytA-DAAO-induced cell death. We pretreated cells with two calcium chelators in order to inhibit extracellular calcium uptake (EGTA) or intracellular calcium release from cellular reservoirs (BAPTA/AM). CLytA-DAAO-induced cell death was blocked upon BAPTA/AM treatment whereas cells pretreated with EGTA did not show a decrease in cell death, confirming the importance of intracellular calcium release in this process. Interestingly, this effect was not only present in the pancreatic and colorectal carcinoma cell lines, but also in glioblastoma cell lines (Figure 1B). However, some tumor cell lines such as the IMIM-PC-2 (pancreatic carcinoma) and HGUE-GB-39 (glioblastoma) cell lines did not respond to these treatments with a significant change in cell death. Together, these findings suggest that calcium mobilization inside the cell is essential for the cell death effect shown in most cell lines. Moreover, the results observed in IMIM-PC-2 and HGUE-GB-39 indicate the existence of other mechanisms involved in the mitochondria membrane depolarization that does not include intracellular calcium mobilization and its possible entry into the mitochondria.

Regarding glioblastoma cell lines, the movement of calcium from the ER to the mitochondria, and the consequent lowering of the MMP, is one of the events that usually occurs in the apoptotic process [15]. Our results with the MMP and calcium mobilization led us to hypothesize that the CLytA-DAAO-induced cell death in pancreatic and colorectal cell lines could be parthanatos, a necrosis-like cell death related to oxidative stress and DNA damage, in which intracellular calcium mobilization associated with a dissipation of the mitochondrial membrane potential occurs [13,16].

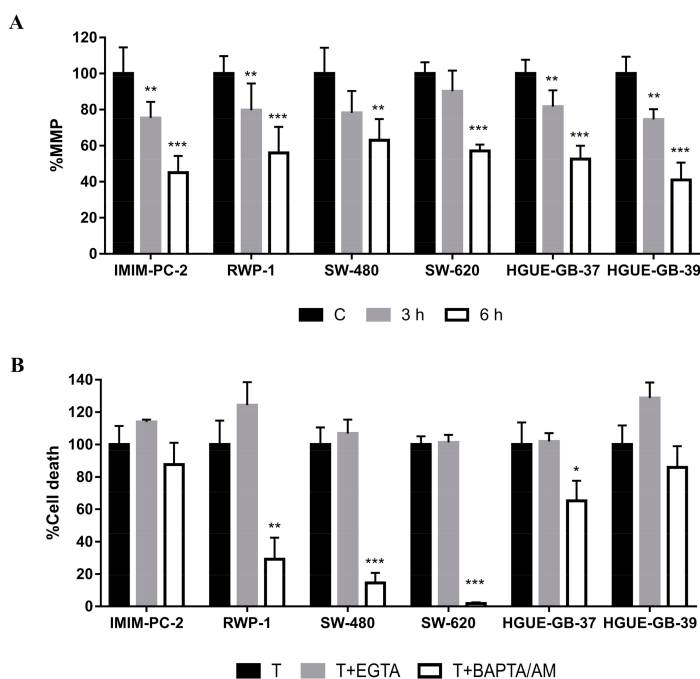


Figure 1. Role of mitochondrial membrane potential (MMP) and calcium in CLytA-DAAO-induced cell death. **(A)** IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 3 or 6 h and the MMP was determined using MitroTracker Green FM and MitoTracker Red CMXRos fluorescent dyes. Data represent the percentage of MMP, normalized with the control cells (Cs) as 100% \pm SD with $n \geq 6$. **(B)** IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T) in the presence or absence of BAPTA/AM or EGTA as described in the materials and methods section and cell death was determined by flow cytometry. Data represent the percentage of cell death, normalizing the treatment with CLytA-DAAO as 100% \pm SD with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001 .

2.2. CLytA-DAAO Induces Different Cell Death Mechanisms Depending on the Carcinoma Cell Lines

Because PARP-1 mediates parthanatos when it is overactivated, we investigated the role of PARP-1 in CLytA-DAAO-induced cell death, pretreating pancreatic and colorectal carcinoma cell lines with 3,4-Dihydro-5(4-(1-piperindinyl)butoxy)-1(2H)-isoquinoline (DPQ), a PARP inhibitor [17,18]. PARP-1 has a double role in the DNA damage response; it is involved in the DNA base-excision repair system and it also promotes parthanatos cell death when intense DNA damage exists [14]. Our previous observations in glioblastoma cell lines indicate that PARP-1 inhibition potentiates CLytA-DAAO-induced cell death [11]. After inhibiting PARP-1, CLytA-DAAO-induced cell death decreased in all the pancreatic and colorectal carcinoma cell lines tested, with the exception of the IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line (Figure 2), suggesting that PARP-1 plays a role in CLytA-DAAO-induced cell death in most of the cell lines tested.

AIF exits from the mitochondria to cytosol and its subsequent entry into the nucleus is a characteristic process that occurs both in apoptosis [15,19] and parthanatos cell death [20,21]. Next, we sought to understand whether CLytA-DAAO-induced cell death involves AIF translocation in our three cancer models. To determine the AIF location before and after the CLytA-DAAO treatment, immunocytochemistry was performed using a specific AIF antibody and cells were visualized by confocal microscopy. Consistent with our previous studies, our analyses after CLytA-DAAO treatment revealed AIF translocation from mitochondria to the nucleus mainly in HGUE-GB-37

and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines as expected in apoptotic cell death. Among pancreatic and colorectal carcinoma cell lines, AIF translocation to the nucleus was detected predominantly in RWP-1, followed by SW-620, and was hardly observed in SW-480 and IMIM-PC-2. To validate these observations, we performed densitometry measurements where the green fluorescence intensity in the nucleus was quantified (Figure S1).

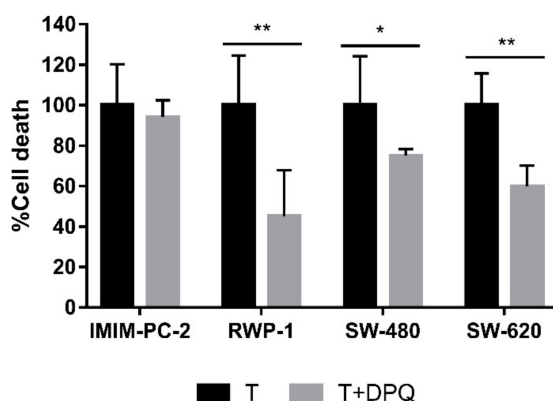


Figure 2. Effect of PARP-1 inhibition in CLytA-DAAO-induced cell death. IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480 and SW-620 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T), in the presence or absence of 3,4-Dihydro-5(4-(1-piperindinyl)butoxy)-1(2H)-isoquinoline (DPQ) for 24 h and cell viability was determined by flow cytometry. Data represent the percentage of cell death, normalizing the treatment with CLytA-DAAO as 100% \pm SD with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 and ** p -value < 0.01 .

Remarkably, the nuclear AIF levels were much lower in all cell lines as compared with those observed in glioblastoma cell lines. Furthermore, cell lines with low AIF nuclear translocation presented an accumulation in the perinuclear region (Figure 3). It is possible that a different time-course after treatment may be necessary to detect a significant AIF entry into the nucleus in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines, or maybe AIF accumulates in the perinuclear region colocalized with chromatin, as has been observed in some types of programmed cell death [22–24]. Altogether, these results strongly suggest that CLytA-DAAO-induced cell death is probably parthanatos in the RWP-1 cell line, while in the IMIM-PC-2, SW-480 and SW-620 cell lines the role of AIF requires further analysis.

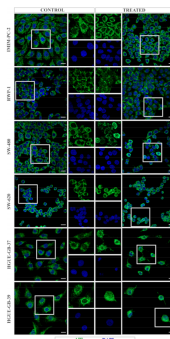


Figure 3. AIF translocation during CLytA-DAAO-induced cell death. IMIM-PC-2, RWP-1, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 cell lines were untreated (C) and treated (T) with CLytA-DAAO and D-Ala for 6 h. Images show AIF (green) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (blue) staining. Central images display an amplification of the white box. Scale bar, 20 μ m.

2.3. MAPKs Pathways Are Involved in CLytA-DAAO-Induced Cell Death

To identify potential regulatory mechanisms responsible for CLytA-DAAO-induced cell death, we studied some of the main signaling pathways affected by oxidative stress and DNA damage. Among the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, we have mainly focused on those leading to the activation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs), c-Jun N-terminal kinases (JNK) and p38 mitogen-activated protein kinases (p38) [25]. We investigated whether activation or inhibition of these three kinases appears after short CLytA-DAAO and D-Ala treatments in a sensitive and a resistant cell line to CLytA-DAAO-induced cell death. In the sensitive cell line, IMIM-PC-2, a significant increase in phosphorylation of the three kinases took place as shown in Figure 4A. In contrast, the resistant cell line, Hs766T, only showed significant changes in JNK and p38. Strikingly, after 30 min of treatment, JNK phosphorylation increased while p38 phosphorylation decreased.

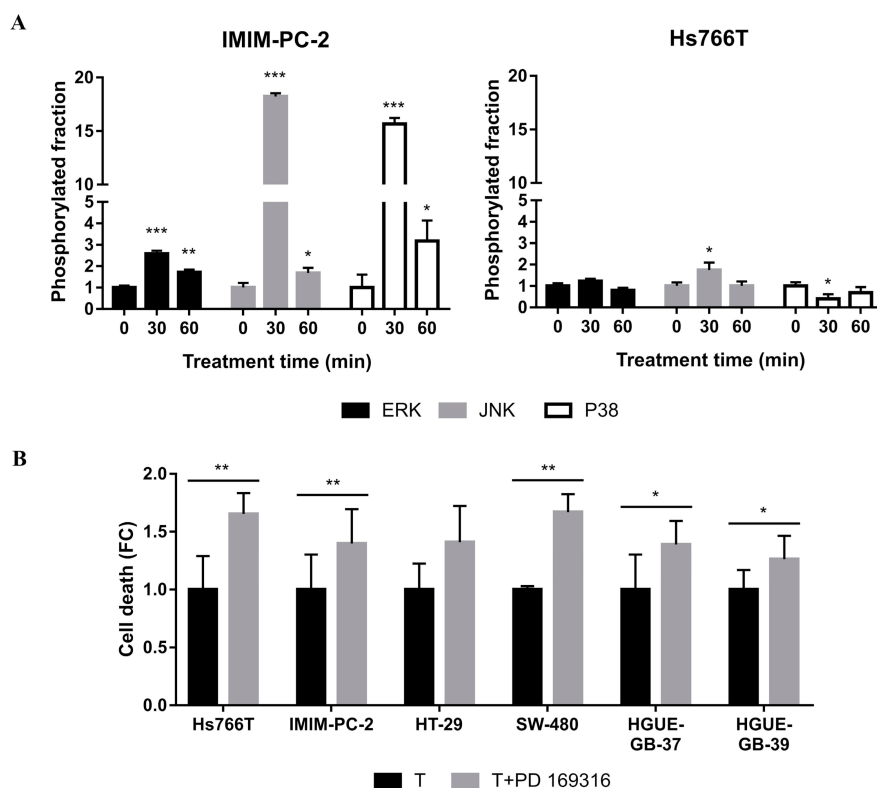


Figure 4. MAPK implication in CLytA-DAAO-induced cell death. (A) IMIM-PC-2 and Hs766T cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 30 min and 1 h and ERK, JNK and P38 phosphorylation was determined by ELISA assay. Data represent the fraction of MAPK phosphorylation, normalizing the phosphorylation in control cells as $1 \pm \text{SD}$ with $n \geq 3$. (B) Hs766T, IMIM-PC-2, HT-29, SW-480, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T) in the presence or absence of PD 169316, a p38 inhibitor, for 24 h and cell viability was determined by flow cytometry. Data represent the cell death fraction, normalizing the treatment with CLytA-DAAO as $1 \pm \text{SD}$ with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001 .

Next, we asked whether ERK, JNK and p38 kinases play a role in CLytA-DAAO-induced cell death. To this end, we pretreated cells with inhibitors of these three kinases in our cell models. We pretreated the cell lines with an inhibitor of the principal ERK activator, MEK1/2 (AZD6244), and a JNK inhibitor (SP600125). We were unable to detect a significant change in cell death induced by CLytA-DAAO in any of the tested cell lines (Hs766T, IMIM-PC-2, RWP-1, HT-29, SW-480, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39)

(data not shown). However, pretreating the cells with PD 169316, a P38 inhibitor, led to a general increase in CLytA-DAAO-induced cell death in all cell lines tested (Figure 4B). These results suggest that in response to CLytA-DAAO, cells display a stress and inflammatory defensive response, mediated by p38.

2.4. Molecular Mechanisms Involved in the Acquisition of Resistance to CLytA-DAAO-Induced Cell Death

CLytA-DAAO-induced cell death has been studied on several pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines. The Hs766T pancreatic carcinoma cell line and HT-29 colorectal carcinoma cell line have been previously identified as resistant to CLytA-DAAO-induced cell death [11]. Furthermore, the resistance mechanism to induced cell death seems to be different between cell lines since the increase in intracellular reactive oxygen species (ROS) and DNA damage was greater in the Hs766T cell line as compared with the HT-29 cell line [11]. Hs766T presented a ROS increase of 2.25 ± 0.08 -fold whereas HT-29 showed only 1.36 ± 0.03 -fold after 2 h of treatment. On the other hand, histone H2A.X phosphorylation increased to $51.48 \pm 2.93\%$ in Hs766T and to $37.14 \pm 3.67\%$ in HT-29 with respect to the control after 3 h of treatment, indicating greater DNA damage in Hs766T than in HT-29 (data not shown). Therefore, we hypothesized that the resistant mechanism in HT-29 was mostly related to ROS detoxification, while in the Hs766T cell line the resistant mechanism was related to the reparation of cell damage induced by ROS.

As shown above, a key phenomenon for CLytA-DAAO-induced cell death is mitochondrial membrane depolarization (Figure 1A). Therefore, we asked whether the MMP changes are correlated with cell line resistance to cell death. We have found that the MMP changes in HT-29 were quite similar to those observed in the sensitive cell lines RWP-1 and SW-480. However, in the Hs766T cell line the mitochondrial membrane depolarization was significantly lower than in CLytA-DAAO-induced cell death-sensitive cell lines (Figure 5A,B), suggesting that there is a direct relationship between cell line resistance and MMP changes.

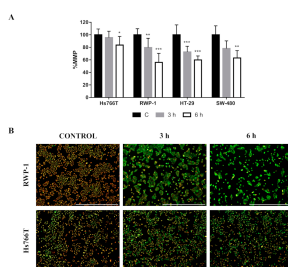


Figure 5. Role of MMP in resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. **(A)** Hs766T, RWP-1, HT-29 and SW-480 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 3 or 6 h and the MMP was determined using MitoTracker Green FM (all mitochondria staining) and MitoTracker Red CMXRos (polarized mitochondria staining) fluorescent dyes. Data represent the percentage of MMP, normalizing the control cells (C) as $100\% \pm SD$ with $n \geq 6$. * indicates a p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001 . **(B)** Representative fluorescent images of RWP-1 and Hs766T cell lines treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 0, 3 or 6 h are shown. Scale bars, 1000 μm .

Together, these findings suggest that there are a series of events taking place during CLytA-DAAO-induced cell death where an intracellular ROS increase is the first step. Then, the mitochondrial membrane is depolarized by calcium uptake by the mitochondria or another alternative mechanism. This depolarization leads to the release of AIF, cytochrome c and, probably, Endo-G by the mitochondria. Finally, DNA damage occurs as a consequence not only of the chromatin fragmentation caused by AIF (and Endo-G), but also by the direct effect of ROS on DNA. Therefore, we concluded that the Hs766T resistance mechanism to CLytA-DAAO-induced cell death is dual, inhibiting the MMP decrease and increasing DNA repair mechanisms.

P38 is a MAPK activated in response to stress that initiates an inflammatory response [26,27]. Having demonstrated that the P38 inhibition significantly enhances the cell death in Hs766T (Figure 4), we next assessed the influence of the proinflammatory signaling pathway. We hypothesized that nuclear factor kappa B (NF- κ B), a transcription factor closely related to cell survival and the inflammatory response [28], could have a pivotal role in the Hs766T resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. NF- κ B phosphorylation was determined in Hs766T and in two additional pancreatic carcinoma cell lines sensitive to CLytA-DAAO-induced cell death (IMIM-PC-2 and RWP-1) after being treated for 1 h. We found that the increase in NF- κ B phosphorylation in the Hs766T cell line was higher than the one observed in the sensitive cell lines (Figure 6A). In addition, we used fluorescence microscopy to confirm NF- κ B translocation to the nuclei after CLytA-DAAO treatment (Figure S2). We next examined the effect of NF- κ B inhibition by pretreating pancreatic and colorectal carcinoma cell lines with BAY 11-7082 before CLytA-DAAO treatment. Interestingly, we found cell death significantly enhanced in both resistant cell lines, Hs766T and HT-29, while CLytA-DAAO-induced cell death in sensitive cell lines was not affected (Figure 6B).

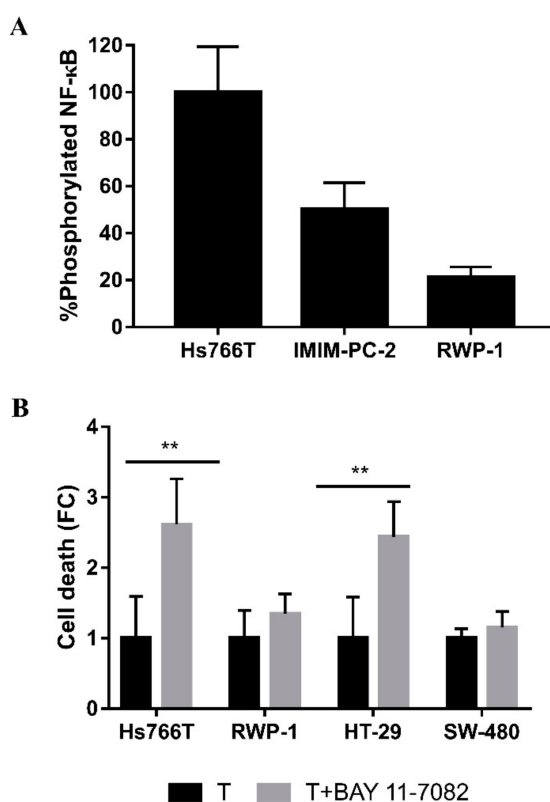


Figure 6. Role of NF- κ B in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. (A) Hs766T, IMIM-PC-2 and RWP-1 cell lines were treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 1 h and NF- κ B phosphorylation was determined by ELISA assay. Data represent the percentage of NF- κ B phosphorylation, normalized with respect to Hs766T \pm SD with $n \geq 3$. (B) Hs766T, RWP-1, HT-29 and SW-480 cell lines were treated for 24 h with CLytA-DAAO and D-Ala (T) in the presence or absence of BAY 11-7082, an NF- κ B inhibitor, and cell death was determined by flow cytometry. Data represent the cell death increase after NF- κ B inhibition, normalizing the treatment with CLytA-DAAO as 1 \pm SD with $n \geq 3$. ** indicates a p -value < 0.01.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), encoded by the *NFE2L2* gene, is another transcription factor that has been related to the oxidative stress response, inflammation and survival [29].

We subsequently investigated *NFE2L2* expression in all cell lines previously studied. We found that Hs766T shows a higher expression as compared with the rest of the cell lines (Figure 7A). In order to understand the importance of *NFE2L2* in cell death, we specifically silenced the *NFE2L2* gene performing siRNA transfection. Overall, a successful blockade of *NFE2L2* expression in the Hs766T cell line (Figure 7B) led to an increase in CLytA-DAAO-induced cell death (Figure 7C).

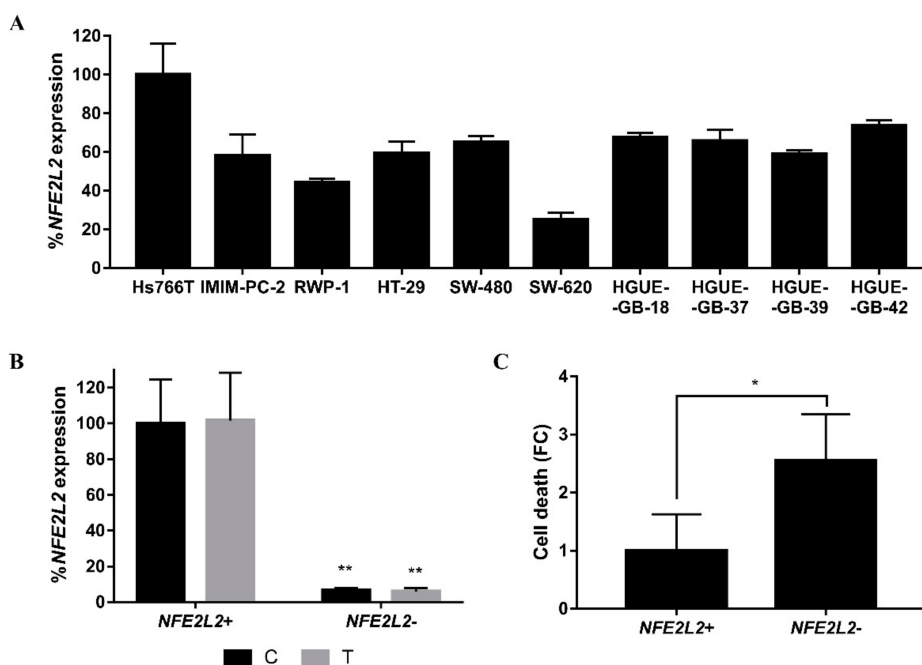


Figure 7. Role of *NFE2L2* in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. (A) *NFE2L2* expression in all pancreatic and colon carcinoma and glioblastoma cell lines previously studied. Data represent the percentage of *NFE2L2* expression, normalized with respect to Hs766T \pm SD with $n \geq 3$. (B) *NFE2L2* expression levels in Hs766T cell line, control (C) and treated (T) with CLytA-DAAO and D-Ala, after being transfected with a non-specific (*NFE2L2*⁺) or an *NFE2L2* siRNA (*NFE2L2*⁻). Data represent the percentage of *NFE2L2* expression, normalized with respect to control transfected with a non-specific siRNA \pm SD with $n \geq 3$. (C) Fold change (FC) of Hs766T cell death after being treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 24 h and transfected with a non-specific (*NFE2L2*⁺) or an *NFE2L2* siRNA (*NFE2L2*⁻). Data represent the cell death increase \pm SD with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 and ** p -value < 0.01 .

Detoxification enzymes are another factor to consider in the resistance to cell death. Given that cell death is generated by a protein that creates oxidative stress, we investigated the role of catalase, which is closely related to free radical detoxification [30]. Consistent with *NFE2L2* observations, catalase expression was higher in Hs766T than in the rest of the cell lines tested (Figure 8A). For this reason, catalase (*CAT*) expression was inhibited in Hs766T and RWP-1, a sensitive cell line to CLytA-DAAO-induced cell death. Inhibition was performed using siRNA and q-PCR assays to verify the results. Experiments with siRNA not only significantly blocked *CAT* expression in both cell lines, but they also showed that *CAT* expression increases three-fold in Hs766T while in RWP-1 decreases approximately by 20% after CLytA-DAAO treatment. Collectively, these results reinforce the important role of *CAT* in the resistance observed in Hs766T (Figure 8B). In order to verify whether changes in the effect induced by the CLytA-DAAO treatment were produced, we inhibited *CAT* expression and then we performed viability assays. After transfection, cell death was increased significantly in Hs766T treated with CLytA-DAAO, but not in the RWP-1 cell line (Figure 8C). In contrast to our initial

hypothesis about a resistance mechanism based on detoxification in HT-29, no significant results with catalase were observed in this cell line (data not shown).

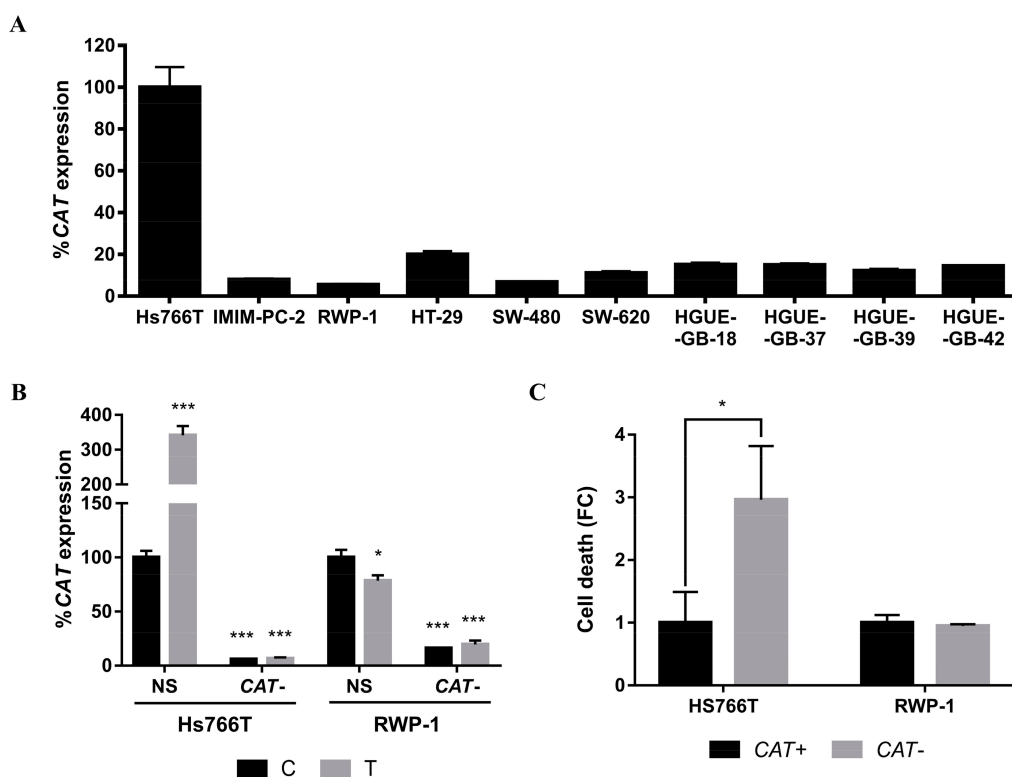


Figure 8. Role of *CAT* in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. (A) *CAT* expression in pancreatic and colon carcinoma and glioblastoma cell lines. Data represent the percentage of catalase expression, normalized with respect to Hs766T \pm SD with $n \geq 3$. (B) *CAT* expression in Hs766T and RWP-1 cell lines, control (C) and treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T), after being transfected with a non-specific (NS) or a catalase siRNA (CAT⁻). Data represent the percentage of catalase expression, normalized with respect to control transfected with a non-specific siRNA \pm SD with $n \geq 3$. (C) Hs766T and RWP-1 cell death after being treated with CLytA-DAAO and D-Ala and transfected with a non-specific (CAT⁺) or a *CAT* siRNA (CAT⁻) for 24 h. Data represent the cell death increase \pm SD with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 and *** p -value < 0.001 .

The role of glutathione peroxidase 2 (GPX2), an antioxidant enzyme, has been previously demonstrated in the proliferation and differentiation of the HT-29 cell line [31,32]. To analyze whether GPX2 has a role in resistance to CLytA-DAAO-induced cell death, *GPX2* expression was studied in all cell lines. Results show that this enzyme is highly expressed in HT-29 and other colorectal carcinoma cell lines while its expression is very low in pancreatic carcinoma and glioblastoma cell lines (Figure 9A). Although SW-620 is not resistant to CLytA-DAAO-induced cell death, its basal expression was also very high. Therefore, we performed a *GPX2* siRNA transfection assay in both cell lines to verify whether GPX2 is important in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. Both cell lines transfected with a *GPX2* siRNA or a non-specific siRNA (Figure 9B) were treated with CLytA-DAAO and D-Ala. Cell death did not change in SW-620 whereas there was a significant cell death enhancement in HT-29 (Figure 9C), suggesting a possible participation of GPX2 in the resistance mechanism of HT-29.

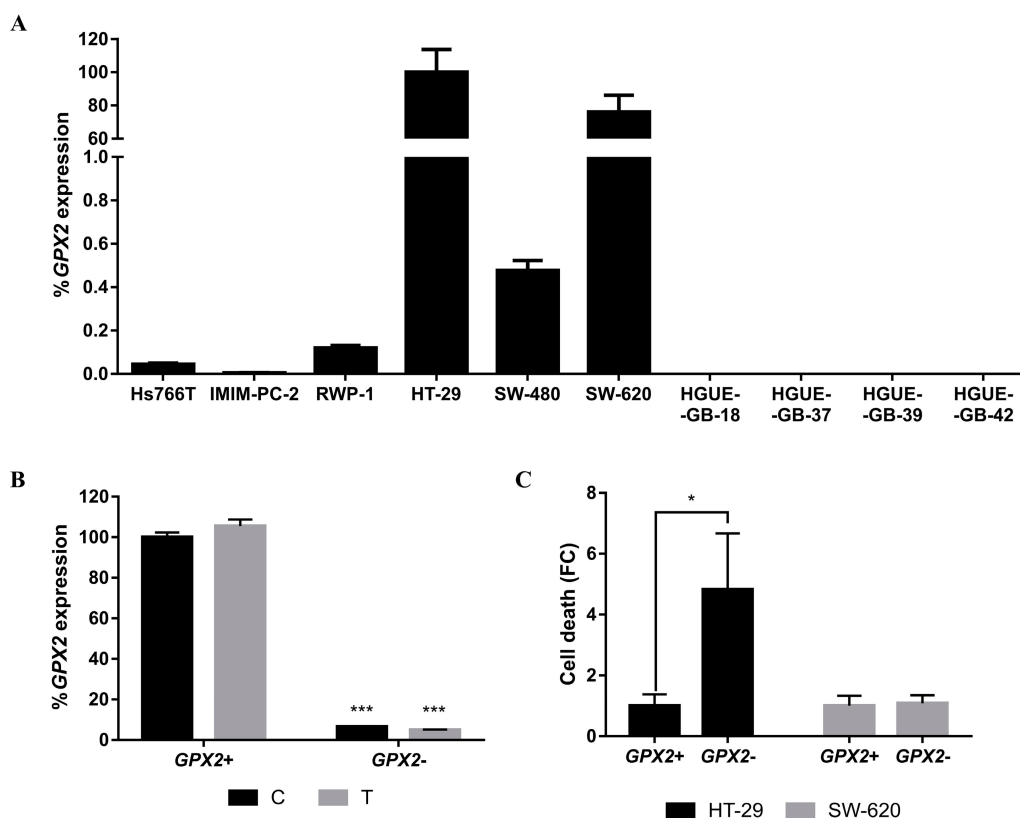


Figure 9. Role of GPX2 in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. (A) GPX2 expression in all cancer cell lines previously studied. Data represent the percentage of GPX2 expression, normalized with respect to HT-29 \pm SD with $n \geq 3$. (B) GPX2 expression levels in HT-29 cell line control (C) and treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T), after being transfected with non-specific (GPX2+) or GPX2 siRNA (GPX2-). Data represent the percentage of GPX2 expression, normalized with respect to control transfected with non-specific siRNA \pm SD with $n \geq 3$. (C) HT-29 and SW-620 cell death after being treated with CLytA-DAAO and D-Ala for 24 h and transfected with non-specific (GPX2+) or GPX2 siRNA (GPX2-). Data represent the percentage of cell death \pm SD with $n \geq 3$. * indicates a p -value < 0.05 and *** p -value < 0.001 .

BRAF, a member of the RAF family of serine/threonine kinases, is essential to the regulation of cellular growth, proliferation and survival. Mutations in the BRAF gene have been described in several types of tumors [33] and it is widely known that the HT-29 cell line has a mutated BRAF (V600E) while the other colorectal carcinoma cell lines tested (SW-480 and SW-620) harbor wild type BRAF [34–36]. In order to find out whether BRAF inhibition has an effect on the colorectal carcinoma resistant cell line HT-29, we used sorafenib as BRAF inhibitor. Probably due to the non-specific nature of the BRAF inhibitor, pretreatment with sorafenib resulted in an increased cell death in both HT-29 and SW-480 cell lines regardless of their BRAF status (Figure 10). Sorafenib can prevent the phosphorylation of other proteins, such as P38 [37], whose inhibition enhances the CLytA-DAAO effect, as described above. Therefore, in addition to detoxification, the inflammatory response may also be involved in HT-29 resistance.

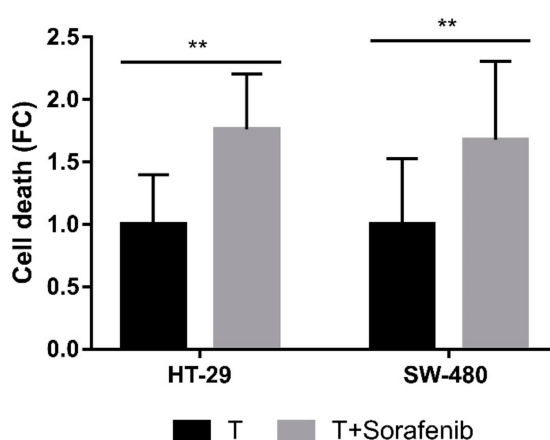


Figure 10. BRAF role in HT-29 resistance to CLytA-DAAO-induced cell death. HT-29 cell line was treated with CLytA-DAAO and D-Ala (T) in the presence or absence of sorafenib for 24 h and cell death was determined by flow cytometry. Data represent the cell death increase \pm SD with $n \geq 3$. ** indicates a p -value < 0.01 .

3. Discussion

Recently, we have demonstrated the ability of CLytA-DAAO to induce cell death in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines as well as in glioblastoma cell lines [11]. The CLytA-DAAO-induced cell death is associated with intracellular ROS increase and DNA damage analyzed through histone H2A.X phosphorylation. Indeed, we observed that glioblastoma cell lines were protected against CLytA-DAAO-induced death after pretreatment with a general caspase inhibitor, suggesting a classical apoptotic cell death. Regarding pancreatic and colorectal carcinoma cell lines, none of the traditional cell death inhibitors protect them from CLytA-DAAO-induced cell death, discarding apoptosis, autophagy, necroptosis and ferroptosis [11].

In this study we evaluated the role of the MMP in the cell death induction caused by CLytA-DAAO treatment. Results shown in Figure 1A indicate that mitochondrial membrane depolarization occurs during the first hours of treatment in all cell lines of the three cancer models. MMP decrease is produced by a sudden increase in the mitochondrial membrane permeability caused by the opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP) [38], suggesting that the cell death evoked by CLytA-DAAO in colon and pancreatic carcinoma is some type of MPT-driven necrosis [3]. It has been widely described that one of the main inducers of PTP opening is calcium [39–41]. Apoptosis-inducing factors usually increase levels of calcium in the cytosol, prior to the MMP decrease and the caspase activation. In fact, intracellular calcium chelators can inhibit apoptotic cell death [42,43]. Additionally, MPT-driven necrosis has been associated with cytoplasmic calcium overload [3].

To determine whether intracellular calcium mobilization plays a role in CLytA-DAAO-induced death, we preloaded the cells with BAPTA/AM, a calcium chelator, to inhibit any intracellular calcium mobilization when CLytA-DAAO was added. To discard any effect mediated by extracellular calcium uptake, we performed parallel experiments where EGTA was added to the cell culture medium to eliminate calcium before CLytA-DAAO addition. The results showed that only BAPTA/AM had a protective effect (Figure 1B), demonstrating the importance of intracellular calcium movement within the cell to trigger the CLytA-DAAO-induced cell death.

Intracellular calcium is mainly stored in endoplasmic reticulum (ER). Recent studies reported that an uncontrolled ROS increase, such as that produced by the reaction catalyzed by CLytA-DAAO, causes ER stress resulting in calcium release through the inositol-1,4,5-triphosphate receptor (IP3R) and its entrance to the mitochondria [13,44,45]. In future studies, the relationship between CLytA-DAAO-induced cell death and ER stress should be addressed.

Altogether, our results reveal different cell death mechanisms triggered by CLytA-DAAO and D-Ala treatment depending on the cellular context; so far, apoptotic cell death in glioblastoma and some type of MPT-driven necrosis in colon and pancreatic carcinomas. Broadly, we found that the mitochondrial membrane depolarization is crucial in all cell models tested. Moreover, our results suggest that this decrease in MMP is mediated by the entry of calcium into the mitochondria in most cases. The different cell death mechanisms observed are explained in detail below and a general scheme of the cell death mechanism induced by CLytA-DAAO is displayed in Figure 11.

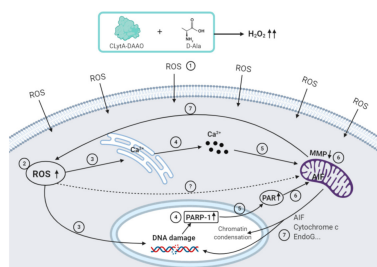


Figure 11. The general mechanism of cell death induced by CLytA-DAAO. The reaction catalyzed by CLytA-DAAO when oxidizing D-Ala generates H_2O_2 , a potential reactive oxygen species (ROS) producer. ROS enters the cell (1) and its accumulation inside the cell (2) induces a calcium release from the endoplasmic reticulum (ER) (3) to the cytosol (4) through IP3R channels and direct damage to DNA (3). The calcium released is directed to the mitochondria (5), causing mitochondrial membrane depolarization (6) and, consequently, promoting additional ROS production (7). In turn, the MMP decrease is associated with the exit of proteins from the mitochondria, which finally causes DNA fragmentation and chromatin condensation, such as AIF, cytochrome c, Endo G, etc. (7). On the other hand, when the ROS-induced DNA damage is very high, there is an overactivation of PARP-1 (4), which leads to an accumulation of the PAR polymer in the cytosol (5), which also causes AIF translocation from the mitochondria to the nucleus (6). The results obtained in IMIM-PC-2 suggest that, in addition, ROS are capable of acting directly on the mitochondrial membrane by an unknown mechanism (?), since depolarization is produced but calcium does not play a role in cell death (Created with BioRender.com).

Regarding glioblastoma cell lines, in a previous work we already stated that a pan-caspase inhibitor is capable of protecting against CLytA-DAAO-induced cell death and Bax inhibition generates partial protection [11]. The two main types of apoptosis are those induced by extrinsic and intrinsic pathways. However, mitochondria play a more important role in the intrinsic pathway, which is mediated by DNA damage, calcium overload and oxidative stress. In this pathway, cytochrome c is released from the cytosol and assembles with Apaf-1, procaspase-9 and dATP, causing caspase-9 activation [46]. Furthermore, in the intrinsic pathway, proapoptotic proteins such as AIF, EndoG, Smac, Omi, etc. are released from the mitochondria and AIF and EndoG are translocated to the nucleus, where they induce chromatin condensation and DNA fragmentation [47].

We have observed that mitochondrial membrane depolarization occurs in glioblastoma (Figure 1A) and CLytA-DAAO-induced cell death is partially dependent on intracellular calcium movement in HGUE-GB-37. However, the partial protection due to its inhibition with BAPTA/AM does not occur in HGUE-GB-39 (Figure 1B). Next, analysis of the AIF location by immunocytochemistry shows that AIF translocation to the nucleus is produced in both cell lines (Figure 3). Therefore, our results suggest that the intrinsic pathway plays a key role. Furthermore, a caspase-8 inhibitor has only a very modest effect on CLytA-DAAO-induced cell death in glioblastoma cell lines (data not shown), confirming that the intrinsic apoptosis pathway is the principal mechanism involved in CLytA-DAAO-induced cell death in glioblastoma.

Regarding the colon and pancreatic carcinoma cell lines, to try to more precisely define the cell death mechanisms evoked by CLytA-DAAO, we determined the effect of PARP-1 inhibition.

It is well known that PARP-1 plays a dual role in DNA damage response (DDR). On one hand, when damage is slight, PARP-1 activation participates in the DNA base-excision repair system. On the other hand, when intense damage occurs, PARP-1 overactivation induces a cytotoxic PAR polymer accumulation in the cytosol leading to cell death [14]. We recently published work showing that, after the inhibition of PARP-1, an enhancement of the CLytA-DAAO effect can be observed in glioblastoma cell lines [11]. This implies that PARP-1 is essentially participating in DNA damage repair in glioblastoma cell lines. This prompted us to study the role of PARP-1 in CLytA-DAAO-induced cell death in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. In order to answer this question, we used DPQ, a PARP-1 inhibitor, in combination with CLytA-DAAO treatment. CLytA-DAAO-induced cell death was significantly blocked when PARP-1 was inhibited in RWP-1, SW-480 and SW-620 cell lines but not in IMIM-PC-2 (Figure 2).

Our results reveal different cell death mechanisms triggered by CLytA-DAAO and D-Ala treatment in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. In RWP-1, we observed a protective effect of DPQ (Figure 2), AIF translocation from mitochondria to the nucleus (Figure 3), the requirement of intracellular calcium mobilization for induced cell death (Figure 1B), and the consequent mitochondrial membrane depolarization (Figure 1A). Together, the present findings support the idea that in the RWP-1 cell line the MPT-driven necrosis could be more precisely described as a necrosis-like cell death induced by oxidative stress and DNA damage called parthanatos.

The calcium influx into the mitochondria causes mitochondrial membrane depolarization triggering a greater release of ROS from the mitochondria [48]. This process contributes to the final parthanatos cell death [13]. On the other hand, SW-480 and SW-620 seem to undergo another non-apoptotic cell death, which has also been reported, induced by oxidative stress, PARP-1 overactivation, calcium mobilization and it is AIF independent [12].

Finally, DPQ pretreatment did not induce significant changes in CLytA-DAAO-induced cell death in IMIM-PC-2 (Figure 2). Indeed, AIF did not enter the nucleus but kept surrounding it (Figure 3). For this cell line, we propose a caspase-independent programmed cell death that has been described in which AIF is released from mitochondria and is accumulated in the perinuclear region colocalized with chromatin at early stages [22–24].

To further characterize CLytA-DAAO-induced cell death mechanisms, we studied the role of different signal transduction pathways in cell death induction as well as in the resistance observed in some cellular models.

We have studied whether the MAPK signal pathways plays a role in the CLytA-DAAO-induced cell death. This pathway is involved in the regulation of many biological processes and it is usually altered in pathological conditions such as cancer [49]. It is known that oxidative stress and DNA damage activate the DDR, which is normally regulated by MAPKs [25]. Mammalian MAPKs include ERKs, JNKs and p38. ERKs are the mitogenic response pathway, mainly related to cell proliferation, survival and differentiation [50]. Instead, JNK and p38 are activated in response to stress and participate in several biological processes—survival, cell death and inflammatory processes, among others [51,52].

In the IMIM-PC-2 cell line, which is sensitive to CLytA-DAAO-induced cell death, the activation of the three MAPKs was observed, being more pronounced in JNK and P38 phosphorylation than that of ERK. Instead, in the Hs766T cell line, which is resistant to the effects of CLytA-DAAO, changes in activation levels were quite modest. Even more, JNK activation increased while p38 activation decreased and no changes in ERK phosphorylation levels were observed (Figure 4A). In order to evaluate the impact of these changes in CLytA-DAAO-induced death in all three cancer models, inhibitors against ERK, JNK and p38 were tested with CLytA-DAAO and D-Ala treatment. Neither pretreatment with an MEK1/2 inhibitor (AZD6244) nor with a JNK inhibitor (SP600125) produced significant variations in CLytA-DAAO-induced cell death in any of the cell lines tested (data not shown). This suggests that the JNK overactivation observed in IMIM-PC-2 is probably an initial survival attempt to repair the damage caused by the treatment. However, we found that p38 plays a crucial protective role against CLytA-DAAO treatment in both sensitive and resistant cell lines

(Figure 4B). This finding is in accordance with previous reports linking the p38 signaling pathway with poor prognosis and with resistance to tamoxifen, androgen deprivation therapy, trastuzumab, cisplatin, etc. [53].

We next sought to gain insight into the CLytA-DAAO-induced cell death by studying the resistance mechanisms observed in some cell lines. We have recently published that some cell lines are totally or partially resistant to CLytA-DAAO-induced cell death. Among all the studied cell lines, Hs766T, a pancreatic carcinoma cell line, and HT-29, a colorectal carcinoma cell line, were the most resistant [11]. We established that there is an increase in ROS levels and histone H2A.X phosphorylation, related to DNA damage, after CLytA-DAAO treatment in Hs766T, but not in HT-29 [11]. This suggests a different resistance mechanism in both cell lines—one focused on the damage response and repair, and the other associated with ROS detoxification.

Furthermore, in the current study we have shown that intracellular calcium mobilization (Figure 1B) and mitochondrial membrane depolarization (Figure 1A) are also necessary for CLytA-DAAO-induced death. Nevertheless, Hs766T was the only resistant cell line that shows a lower MMP decrease in comparison with sensitive cell lines (Figure 5), suggesting that its resistance mechanism is related to the damage response and repair. Interestingly, previous studies have proved that the Hs766T cell line is resistant to common treatments such as gemcitabine, 5-fluoracil or cisplatin [54]. Additionally, unlike the rest of the tumor cell lines tested, this cell line does not present a p53 mutation [55,56], which gives it a greater response to drugs that induce DNA damage [57,58].

Taking into consideration that p38 inhibition significantly enhances death in Hs766T (Figure 4B) and p38 is related to the oxidative stress response and inflammation, we next analyzed NF- κ B's role in resistance. NF- κ B is a transcription factor also related to survival and inflammation which is additionally regulated by p38 phosphorylation [59,60]. After CLytA-DAAO treatment, Hs766T showed a higher NF- κ B activation as compared to CLytA-DAAO-sensitive cell lines (Figure 6A). Consistently, NF- κ B inhibition resulted in a significant enhancement of Hs766T cell death (Figure 6B).

Another signaling pathway activated in the stress response is Nrf2. Under normal conditions, Nrf2 is bound to Keap1, and when cells are exposed to stress, the dimer is split and Nrf2 targets the nucleus to activate the expression of genes related to the antioxidant response [61]. It is described that the separation of Nrf2 and Keap1 occurs through the phosphorylation of Nrf2, caused by ERK and p38 [62]. *NFE2L2* is the gene that encodes Nrf2 and it is basally more expressed in Hs766T than in the rest of pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cell lines (Figure 7A). Furthermore, the transfection of siRNA molecules against *NFE2L2* followed by CLytA-DAAO treatment (Figure 7B) increases sensitivity to cell death (Figure 7C). Although it is described that there is an inverse relationship between Nrf2 and NF- κ B [63], our results reveal that the high expression and/or activation of both are necessary to protect cells from the CLytA-DAAO effect.

Expanding our analyses to the detoxification mechanism, we studied catalase as the main antioxidant enzyme. Interestingly, basal catalase overexpression was observed in Hs766T but not in HT-29 (Figure 8A). Moreover, after treatment with CLytA-DAAO, catalase levels increased about three-fold (Figure 8B) and blocking catalase expression with a specific siRNA led to a significant increase in CLytA-DAAO-induced death (Figure 8C). Consistently with catalase expression, siRNA transfection against catalase in HT-29 resulted in no significant changes in CLytA-DAAO-induced death (data not shown).

Overall, our results suggest that in Hs766T the calcium entry into the mitochondria and the consequent MMP decrease does not occur and its resistance is mediated by a high expression and/or activation of p38, NF- κ B, Nrf2 and catalase. All these factors are related to ER stress, which leads us to presume that Hs766T has a high basal ER stress, which causes its resistance to the oxidative stress generated by CLytA-DAAO treatment. The relationship among catalase, Nrf2, NF- κ B, p38 and ER stress is shown in Figure S3. Other authors have described that high ER stress may be related to resistance to different drugs used in the treatment of breast cancer [64], chronic myelogenous leukemia [65] and cutaneous melanoma [66]. The ER stress response is mediated by three proteins

located in the ER membrane: inositol-requiring 1 alpha (IRE1 α), double-strand RNA-activated protein kinase-like ER kinase (PERK) and activating transcription factor 6 (ATF6) [67]. However, most articles relate IRE1 α with the ER stress-mediated drug resistance [65,66]. IRE1 α is responsible for the splicing of x-box binding protein 1 (XBP1) [68]. Therefore, we measured the expression levels of the transcription factor XBP1 that were overexpressed in Hs766T in comparison to the rest of cell lines (data not shown). Further analysis will be needed to confirm whether Hs766T resistance is mediated by increased basal ER stress with respect to the rest of sensitive cell lines.

The role of GPX2, a detoxification enzyme, has been previously described in HT-29 cell survival [31,32]. Notably, a V600E mutation in BRAF, a serine/threonine-protein kinase that is involved in the RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway, is considered a poor prognosis marker that induces resistance to many therapies [36,69,70]. When V600E mutations exist in BRAF, BRAF is constitutively activated, causing the continued phosphorylation of MEK and ERK and thus, promoting the growth, proliferation, differentiation, migration and survival of tumor cells [70].

Moreover, we observed that GPX2 was highly expressed in HT-29 and SW-620 (Figure 9A) and GPX2 expression inhibition with a specific siRNA (Figure 9B) sensitizes HT-29 to the CLytA-DAAO effect (Figure 9C). On the other hand, pretreating cells with sorafenib results in an increase in the CLytA-DAAO effect, but there was no difference between the potentiation observed in HT-29 and SW-480 (Figure 10). These findings suggest that BRAF mutation is not responsible for its resistance. This conclusion is in accordance with the result obtained with the AZD6244 pretreatment, in which no modifications in cell death were obtained after inhibiting MEK (data not shown). We have shown an increase in cell death in HT-29 through inhibition of both P38 (Figure 4B) and NF- κ B (Figure 6B), which suggests the participation of the inflammatory response in resisting CLytA-DAAO-induced cell death. It has been demonstrated that sorafenib is a poorly selective BRAF inhibitor and that one of the targets is p38 [37]. Thus, HT-29 resistance is mediated both by GPX2, an antioxidant protein, and by p38 and NF- κ B, which participate in the inflammatory response against oxidative damage.

This work highlights the fact that CLytA-DAAO induces apoptotic and necrosis-like cell death depending on the cellular context. We have identified several cell death-induced mechanisms that take place on the tumor cell lines studied. This capacity to adapt to the environment of each cancer type and induce cell death by different mechanisms give CLytA-DAAO treatment a broad spectrum of putative cell targets, increasing the possibility to use the enzymes in many types of cancer cells. Our previous observation, that there is almost no effect on non-tumoral cell models such as fibroblasts, pancreatic cells, lymphocytes and adipocytes, further supports this idea. Similarly, resistance to CLytA-DAAO-induced death is not due to the presence of a single mechanism capable of blocking the damage generated, but rather to the interconnection of several pathways.

Finally, these data, while providing a unique tool against tumor cells, also need to be tested in patients. Therefore, we are currently starting a pilot study using biopsies from patients with pancreatic or colorectal carcinomas and glioblastomas. We will analyze the expression of the identified genes to evaluate the expression profile of the identified genes involved in the resistance to CLytA-DAAO-induced cell death in cancer patients. Knowledge of the mechanisms and pathways involved in both CLytA-DAAO-induced death and resistance is pivotal for this enzyme treatment to ultimately become an effective anticancer therapy.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

RWP-1, IMIM-PC-2 and Hs766T pancreatic adenocarcinoma cell lines, SW-480, SW-620 and HT-29 colorectal carcinoma cell lines and HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39 and HGUE-GB-42 glioblastoma cell lines were used. Glioblastoma cell lines were derived from primary cell cultures established by our group in the "Hospital General Universitario de Elche" (HGUE) [71]. All cell lines used in this study were maintained as previously described [11].

4.2. Chemical Reagents

In total, 2 units mL⁻¹ (U mL⁻¹) of CLytA-DAAO in combination with 1 mM D-Alanine (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Kandel, Germany) were used. CLytA-DAAO was obtained and isolated from *Escherichia coli* BL21 (DE3), transformed with the plasmid pCPC21. The isolation process of CLytA-DAAO and the measurement of its enzymatic activity have been previously described [11].

All the chemical reagents mentioned below were used to study the mechanism of cell death induced by CLytA-DAAO.

To analyze the role of calcium in CLytA-DAAO-induced cell death, 5 μM 1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester) (BAPTA/AM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), an intracellular calcium chelator, and 100 μM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), an extracellular calcium chelator, were used.

To evaluate whether PARP-1 participates in CLytA-DAAO-induced cell death, 10 μM 3,4-Dihydro-5(4-(1-piperindinyl)butoxy)-1(2H)-isoquinoline (DPQ) (Calbiochem®, San Diego, CA, USA), a PARP inhibitor III, was tested.

In total, 10 μM 4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole (PD 169316) (Calbiochem®, San Diego, CA, USA), a p38 MAP kinase inhibitor, was used to demonstrate the role of p38 in cell death induced by CLytA-DAAO.

Finally, 5 μM (E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile (BAY 11-7082) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), an NF-κB inhibitor and 1 μM N-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-N'-(4-(2-[N-methylcarbamoyl]-4-pyridyloxy)phenyl)urea (sorafenib) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), were used to define the role of NF-κB and BRAF in the resistance to cell death observed in Hs766T.

The previous reagents, with the exception of BAPTA/AM, were added 30 min before treatment with CLytA-DAAO and D-Ala and kept in the medium throughout the treatment time. BAPTA/AM was added 1 h before CLytA-DAAO and was withdrawn from the medium after this time.

4.3. Cell Death

Cell death was determined through the permeability of the plasmatic membrane; for this purpose, six-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) were used. After the treatment time, cells were harvested by trypsinization and the Muse® Count & Viability Kit (Luminex®, Austin, TX, USA) was added following the manufacturer's instructions. Cell death was determined using the Muse® Cell Analyzer (Luminex®, Austin, TX, USA).

4.4. Mitochondrial Membrane Potential

MMP was evaluated using two fluorescent probes: MitoTracker Red CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), capable of labeling all mitochondria that conserve MMP, and MitoTracker Green CMXRos (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), which labels mitochondria independently of the MMP.

Cells were seeded and treated in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). After the treatment time, cells were incubated for 30 min in media with 200 nM MitoTracker Red CMXRos and 200 nM de MitoTracker Green CMXRos. Finally, fluorescence was quantified using Cytation 3 Cell Imaging Multi-mode (BioTek, Winooski, VT, USA).

4.5. Immunocytochemistry

Cells were seeded on glass coverslips located in 24-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany), and treated or not with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 6 h. Then, cells were washed with PBS 1X three times and fixed with 4% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature. Next, to permeate the cells, 0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution was added for 10 min with gentle shaking and, subsequently, the non-specific binding sites were blocked

by incubating cells in a 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) solution for 1 h in agitation. After each incubation, three washes with PBS 1X were performed.

AIF protein was marked using anti-AIF (#4642, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Cells were incubated with a blocking buffer (5% rabbit serum and 0.3% Triton X-100 in PBS 1X) containing the AIF antibody (1%) overnight. As a secondary antibody, a rabbit anti-IgG marked with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added at 1% to blocking buffer and nuclei were marked with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Cells were incubated for 1 h in darkness. After staining, cells were observed and photographed with a confocal microscope—Leica TCS SP2 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.6. ELISA Assay

The MAPK Family (ERK, p38, JNK) Activation InstantOne ELISA™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and phospho-NFκB p65 (Ser536) InstantOne ELISA™ Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) were used. Cells were seeded in a T25 culture flask (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and, once the treatment was finished, the instructions provided by the manufacturer were followed. Finally, the absorbance at 450 nm was quantified on a Gen5™ microplate reader (BioTek, Winooski, VT, USA).

4.7. Gene Expression Analysis

RNA isolation was performed using an NZY Total RNA Isolation kit (NZYtech, Lisbon, Portugal) according to the manufacturer's instructions. A total of 1 µg of the obtained RNA was transformed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using 1 µl predesigned TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 10 µL NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2x), ROX plus (NZYtech, Lisbon, Portugal) and 4 µL cDNA, which was previously obtained. The Taqman Gene Expression Assays used to measure the expression of the following genes were *CAT* (Hs00156308_m1), *NFE2L2* (Hs00975961_g1), *GPX2* (Hs01591589_m1) and *GAPDH* (Hs02786624_g1) as endogenous controls. The 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used.

4.8. Small Interfering RNA (siRNA) Assay

To inhibit gene expression, cells were transfected with specific siRNA against *CAT*, *NFE2L2* and *GPX2*, and a non-specific siRNA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used as a control. Cells were seeded into 6-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) using media without antibiotic, and a solution of Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) containing 2.5 µL/mL Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 5 pmol/mL siRNA was added.

The transfection was carried out for 48 h at 37 °C and then, the corresponding treatment was added. Once the treatment finished, cell death and gene expression were analyzed as described above.

4.9. Statistical Analysis

All results are represented as the mean ± standard deviation (SD) of at least three independent data. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism version 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), as described in our previous work [11].

5. Conclusions

CLytA-DAAO-induced cell death is a phenomenon that is dependent on the cellular context. In glioblastoma cell lines a classical apoptosis mediated by the intrinsic pathway occurs. We have identified several types of necrotic-like cell death being induced in pancreatic and colorectal carcinoma

cell lines. Independently of the cell death type induced by CLytA-DAAO, there are several key players that participate in cell death. In all cell lines there is an intracellular increase in ROS, DNA damage and mitochondrial membrane depolarization. On the other hand, intracellular calcium mobilization, PARP-1 and AIF also play a role in most of the cell models tested.

In addition, although the role of MAPKs pathways has been studied by ELISA and using specific inhibitors, only the p38 pathways appear to play a crucial role in CLytA-DAAO-induced cell death.

Finally, Hs766T resistance to CLytA-DAAO-induced cell death is mediated by antioxidant proteins, such as catalase and Nrf2, and proteins related to survival, stress and inflammatory response such as NF- κ B and p38. HT-29 resistance is mediated not only by NF- κ B and p38, but also by GPX2, an antioxidant protein.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/22/8522/s1>. Figure S1. CLytA-DAAO-induced AIF translocation to the nucleus. AIF levels into the nucleus in RWP-1, IMIM-PC-2, SW-480, SW-620, HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 control (C) and treated (T) with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 6 h. Green fluorescence in the nuclear area was quantified using ImageJ software. Data represent the fold-change (FC) values \pm SEM of the green fluorescence intensity in the nucleus after normalized to the control cells. *** indicates a p -value < 0.001 . Figure S2. CLytA-DAAO-induced NF- κ B translocation to the nucleus. Images show RWP-1 and Hs766T cell lines control and treated with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 1 and 6 h. Immunocytochemistry was performed by labeling NF- κ B with anti-p65 (RelA) (Thermo Scientific) and nuclei were marked with HOESCHT. Images were taken with a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE2000-U) equipped with a digital camera (Nikon DS-1QM). NF- κ B is displayed in red and nuclei in blue. Scale bars, 100 μ M. Figure S3. Schematic representation showing the relationship between some of the genes involved in the Hs766T resistance to CLytA-DAAO-induced cell death and ER stress response. PERK, IRE1 and ATF6 are activated under ER stress conditions. ATF6 migrates to Golgi apparatus and suffers proteolytic activation by S1P and S2P proteases. Then, the processed ATF6 induces XBP-1 mRNA expression, which is processed by IRE-1 to render the active form, which is translocated to the nucleus, where it induces transcriptionally several genes, one of which is catalase. Additionally, IRE1 recruits TRAF2 to activate proteins related to the answer to stress and inflammation, such as P38, JNK and NF- κ B. Finally, PERK phosphorylates NRF2 and EIF2 α , which promotes the translation of ATF4. NRF2 and ATF4 are transcription factors that regulate genes that participate in the antioxidant response. Created with Biorender.com.

Author Contributions: M.S. and J.M.S. participated in conceptualization, funding acquisition, supervision and project administration. M.F.-B., M.P.V. and E.P.-V. participated in investigation and methodology. M.F.-B., P.G.-M., C.A., V.M.B. and M.S. participated in validation and formal analysis of data presented in this article. M.F.-B. and M.S. participated in writing the original draft. Finally, P.G.-M., C.d.J.R., C.A., V.M.B., J.M.S. and M.S. participated in reviewing and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Spanish Instituto de Salud Carlos III, grant number PI01202025, and donations from Association of women affected by breast cancer in Elche and the region (AMACMEC) to M.S., Miguel Servet Program from Instituto de Salud Carlos III (CP19/00095) to C.d.J.R. and grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, grant numbers BIO2013-47684-R and BIO2016-79323-R, and the RETICS-FEDER RICET, RD16/0027/0010, to J.M.S. The CIBER of Enfermedades Respiratorias (CIBERES) is an initiative of the Spanish Instituto de Salud Carlos III and Spanish National Research Council (CSIC Grant 201820I132).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

DAAO	D-amino acid oxidase
CLytA	Choline-binding module of the amidase N-acetylmuramoyl-L-alanine
DEAE	Diethylaminoethanol
PARP-1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
AIF	Apoptosis-inducing factor
MMP	Mitochondrial membrane potential
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
P38	P38 mitogen-activated protein kinase
ROS	Reactive oxygen species
NF- κ B	Nuclear factor kappa B

Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
CAT	Catalase
GPX2	Glutathione peroxidase 2
PTP	Permeability transition pore
ER	Endoplasmic reticulum
IP3R	Inositol-1,4,5-triphosphate receptor
DDR	DNA damage response
IRE1 α	Inositol-requiring 1 alpha
PERK	Double-strand RNA-activated protein kinase-like ER kinase
ATF6	Activating transcription factor 6
XBP1	X-box binding protein 1
HGUE	Hospital General Universitario de Elche (General University Hospital of Elche)
BAPTA/AM	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetrakis(acetoxymethyl ester)
EGTA	Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid
DPQ	3,4-Dihydro-5(4-(1-piperidinyloxy)butoxy)-1(2H)-isoquinoline
PD 169316	4-(4-Fluorophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole
BAY 11-7082	(E)-3-(4-Methylphenylsulfonyl)-2-propenenitrile
Sorafenib	N-(4-Chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-N'-(4-(2-[N-methylcarbamoyl]-4-pyridyloxy)phenyl)urea
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
SEM	Standard Error of the Mean

References

- Degterev, A.; Yuan, J. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 378–390. [[CrossRef](#)]
- D'Arcy, M.S. Cell death: A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol. Int.* **2019**, *43*, 582–592. [[CrossRef](#)]
- Galluzzi, L.; Vitale, I.; Aaronson, S.A.; Abrams, J.M.; Adam, D.; Agostinis, P.; Alnemri, E.S.; Altucci, L.; Amelio, I.; Andrews, D.W.; et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **2018**, *25*, 486–541. [[CrossRef](#)]
- Tang, D.; Kang, R.; Berghe, T.V.; Vandenabeele, P.; Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* **2019**, *29*, 347–364. [[CrossRef](#)]
- Sun, Y.; Peng, Z.L. Programmed cell death and cancer. *Postgrad. Med. J.* **2009**, *85*, 134–140. [[CrossRef](#)]
- Panghal, A.; Sharma, H.; Flora, S.; Naqvi, S. Suicide gene therapy: A promising approach towards gene delivery. *Front. Nanosci. Nanotechnol.* **2019**, *5*, 1–9. [[CrossRef](#)]
- Niculescu-Duvaz, I.; Springer, C.J. Introduction to the Background, Principles, and State of the Art in Suicide Gene Therapy. *Mol. Biotechnol.* **2005**, *30*, 71–88. [[CrossRef](#)]
- Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Piloni, M.S.; Molla, G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1373–1394. [[CrossRef](#)]
- López, R.; García, E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 553–580. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sanchez-Puelles, J.M.; Sanz, J.M.; Garcia, J.L.; Garcia, E. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 153–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fuentes-Baile, M.; Bello-Gil, D.; Pérez-Valenciano, E.; Sanz, J.M.; García-Morales, P.; Maestro, B.; Ventero, M.P.; Alenda, C.; Barberá, V.M.; Saceda, M. CLytA-DAAO, free and immobilized in magnetic nanoparticles, induces cell death in human cancer cells. *Biomolecules* **2020**, *10*, 222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Zhang, F.; Xie, R.; Munoz, F.M.; Lau, S.S.; Monks, T.J. PARP-1 hyperactivation and reciprocal elevations in intracellular Ca²⁺ during ROS-induced nonapoptotic cell death. *Toxicol. Sci.* **2014**, *140*, 118–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Zhong, H.; Song, R.; Pang, Q.; Liu, Y.; Zhuang, J.; Chen, Y.; Hu, J.; Hu, J.; Liu, Y.; Liu, Z.; et al. Propofol inhibits parthanatos via ROS–ER–calcium–mitochondria signal pathway in vivo and vitro. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fatokun, A.A.; Dawson, V.L.; Dawson, T.M. Parthanatos: Mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 2000–2016. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ly, J.D.; Grubb, D.R.; Lawen, A. The mitochondrial membrane potential ($\delta\psi_m$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* **2003**, *8*, 115–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chiu, L.Y.; Ho, F.M.; Shiah, S.G.; Chang, Y.; Lin, W.W. Oxidative stress initiates DNA damager MNNG-induced poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent parthanatos cell death. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *81*, 459–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Suto, M.J.; Turner, W.R.; Arundel-Suto, C.M.; Werbel, L.M.; Sebolt-Leopold, J.S. Dihydroisoquinolinones: The design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des.* **1991**, *6*, 107–117. [[PubMed](#)]
18. Eliasson, M.J.L.; Sampei, K.; Mandir, A.S.; Hurn, P.D.; Traystman, R.J.; Bao, J.; Pieper, A.; Wang, Z.-Q.; Dawson, T.M.; Snyder, S.H.; et al. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption renders mice resistant to cerebral ischemia. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 1089–1095. [[CrossRef](#)]
19. Susin, S.A.; Lorenzo, H.K.; Zamzami, N.; Marzo, I.; Snow, B.E.; Brothers, G.M.; Mangion, J.; Jacotot, E.; Costantini, P.; Loeffler, M.; et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* **1999**, *397*, 441–446. [[CrossRef](#)]
20. Andrabi, S.A.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: Parthanatos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1147*, 233–241. [[CrossRef](#)]
21. David, K.K.; Andrabi, S.A.; Dawson, T.M.; Dawson, V.L. Parthanatos, A messenger of death. *Front. Biosci.* **2009**, *14*, 1116–1128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Daugas, E.; Susin, S.A.; Zamzami, N.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Larochette, N.; Prévost, M.; Leber, B.; Andrews, D.; Penninger, J.; et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J.* **2000**, *14*, 729–739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Akay, C.; Thomas, C.; Gazzit, Y. Arsenic Trioxide and Paclitaxel Induce Apoptosis by Different Mechanisms. *Cell Cycle* **2004**, *3*, 324–334. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Susin, S.A.; Daugas, E.; Ravagnan, L.; Samejima, K.; Zamzami, N.; Loeffler, M.; Costantini, P.; Ferri, K.F.; Irinopoulou, T.; Prévost, M.C.; et al. Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 571–579. [[CrossRef](#)]
25. Rezatabar, S.; Karimian, A.; Rameshknia, V.; Parsian, H.; Majidinia, M.; Kopi, T.A.; Bishayee, A.; Sadeghinia, A.; Yousefi, M.; Monirialamdari, M.; et al. RAS/MAPK signaling functions in oxidative stress, DNA damage response and cancer progression. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234*, 14951–14965. [[CrossRef](#)]
26. Ono, K.; Han, J. The p38 signal transduction pathway Activation and function. *Cell. Signal.* **2000**, *12*, 1–13. [[CrossRef](#)]
27. Cuenda, A.; Rousseau, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1358–1375. [[CrossRef](#)]
28. Taniguchi, K.; Karin, M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: Coming of age. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, *18*, 309–324. [[CrossRef](#)]
29. Ma, Q. Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2013**, *53*, 401–426. [[CrossRef](#)]
30. Glorieux, C.; Calderon, P.B. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biol. Chem.* **2017**, *398*, 1095–1108. [[CrossRef](#)]
31. Emmink, B.L.; Laoukili, J.; Kipp, A.P.; Koster, J.; Govaert, K.M.; Patrai, S.; Verheem, A.; Steller, E.J.A.; Brigelius-Flohé, R.; Jimenez, C.R.; et al. GPx2 suppression of H₂O₂ stress links the formation of differentiated tumor mass to metastatic capacity in colorectal cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 6717–6730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Banning, A.; Kipp, A.; Schmitmeier, S.; Löwinger, M.; Florian, S.; Krehl, S.; Thalmann, S.; Thierbach, R.; Steinberg, P.; Brigelius-Flohé, R. Glutathione peroxidase 2 inhibits cyclooxygenase-2-mediated migration and invasion of HT-29 adenocarcinoma cells but supports their growth as tumors in nude mice. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 9746–9753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nakamura, Y.; Hattori, N.; Iida, N.; Yamashita, S.; Mori, A.; Kimura, K.; Yoshino, T.; Ushijima, T. Targeting of super-enhancers and mutant BRAF can suppress growth of BRAF-mutant colon cancer cells via repression of MAPK signaling pathway. *Cancer Lett.* **2017**, *402*, 100–109. [[CrossRef](#)]
35. Roma, C.; Rachiglio, A.M.; Pasquale, R.; Fenizia, F.; Iannaccone, A.; Tatangelo, F.; Antinolfi, G.; Parrella, P.; Graziano, P.; Sabatino, L.; et al. BRAF V600E mutation in metastatic colorectal cancer: Methods of detection and correlation with clinical and pathologic features. *Cancer Biol. Ther.* **2016**, *17*, 840–848. [[CrossRef](#)]
36. Wu, Z.; Huang, M.; Gong, Y.; Lin, C.; Guo, W. BRAF and EGFR inhibitors synergize to increase cytotoxic effects and decrease stem cell capacities in BRAF(V600E)-mutant colorectal cancer cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* **2018**, *50*, 355–361. [[CrossRef](#)]
37. Wilhelm, S.; Carter, C.; Lynch, M.; Lowinger, T.; Dumas, J.; Smith, R.A.; Schwartz, B.; Simantov, R.; Kelley, S. Discovery and development of sorafenib: A multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2006**, *5*, 835–844. [[CrossRef](#)]
38. Kroemer, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat. Med.* **1997**, *3*, 614–620. [[CrossRef](#)]
39. Kass, G.E.N.; Orrenius, S. Calcium Signaling and Cytotoxicity. *Environ. Health Perspect.* **1999**, *107*, 25–35.
40. Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.* **1999**, *341*, 233–249. [[CrossRef](#)]
41. Halestrap, A.P.; Kerr, P.M.; Javadov, S.; Woodfield, K.Y. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1366*, 79–94. [[CrossRef](#)]
42. Kruman, I.I.; Mattson, M.P. Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 529–540. [[CrossRef](#)]
43. Koya, R.C.; Fujita, H.; Shimizu, S.; Ohtsu, M.; Takimoto, M.; Tsujimoto, Y.; Kuzumaki, N. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 15343–15349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Malhotra, J.D.; Kaufman, R.J. Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress: A Vicious Cycle or a Double-Edged Sword? *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, *9*, 2277–2293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Deniaud, A.; Sharaf El Dein, O.; Maillier, E.; Poncet, D.; Kroemer, G.; Lemaire, C.; Brenner, C. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene* **2008**, *27*, 285–299. [[CrossRef](#)]
46. Vakifahmetoglu-Norberg, H.; Ouchida, A.T.; Norberg, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *482*, 426–431. [[CrossRef](#)]
47. Zhivotovsky, B.; Orrenius, S. Calcium and cell death mechanisms: A perspective from the cell death community. *Cell Calcium* **2011**, *50*, 211–221. [[CrossRef](#)]
48. Görlach, A.; Klappa, P.; Kietzmann, T. The endoplasmic reticulum: Folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 1391–1418. [[CrossRef](#)]
49. Kim, E.K.; Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 396–405. [[CrossRef](#)]
50. Santarpia, L.L.; Lippman, S.; El-Naggar, A. Targeting the Mitogen-Activated Protein Kinase RAS-RAF Signaling Pathway in Cancer Therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* **2012**, *16*, 103–119. [[CrossRef](#)]
51. Ip, Y.T.; Davis, R.J. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)—From inflammation to development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1998**, *10*, 205–219. [[CrossRef](#)]
52. Cuadrado, A.; Nebreda, A.R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* **2010**, *429*, 403–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lee, S.; Rauch, J.; Kolch, W. Targeting MAPK signaling in cancer: Mechanisms of drug resistance and sensitivity. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Arumugam, T.; Ramachandran, V.; Fournier, K.F.; Wang, H.; Marquis, L.; Abbruzzese, J.L.; Gallick, G.E.; Logsdon, C.D.; McConkey, D.J.; Choi, W. Epithelial to mesenchymal transition contributes to drug resistance in pancreatic cancer. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 5820–5828. [[CrossRef](#)]

55. Loukopoulos, P.; Kanetaka, K.; Takamura, M.; Shibata, T.; Sakamoto, M.; Hirohashi, S. Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* **2004**, *29*, 193–203. [[CrossRef](#)]
56. Hempen, P.M.; Kurpad, H.; Calhoun, E.S.; Abraham, S.; Kern, S.E. A double missense variation of the BUB1 gene and a defective mitotic spindle checkpoint in the pancreatic cancer cell line Hs766T. *Hum. Mutat.* **2003**, *21*, 445. [[CrossRef](#)]
57. Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A.J. Surfing the p53 network. *Nature* **2000**, *408*, 307–310. [[CrossRef](#)]
58. Kruiswijk, F.; Labuschagne, C.F.; Vousden, K.H. p53 in survival, death and metabolic health: A lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2015**, *16*, 393–405. [[CrossRef](#)]
59. Lüschen, S.; Scherer, G.; Ussat, S.; Ungefroren, H.; Adam-Klages, S. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase reduces TNF-induced activation of NF- κ B, elicits caspase activity, and enhances cytotoxicity. *Exp. Cell Res.* **2004**, *293*, 196–206. [[CrossRef](#)]
60. Cheng, Y.; Qiu, F.; Ye, Y.C.; Guo, Z.M.; Tashiro, S.I.; Onodera, S.; Ikejima, T. Autophagy inhibits reactive oxygen species-mediated apoptosis via activating p38-nuclear factor-kappa B survival pathways in oridonin-treated murine fibrosarcoma L929 cells. *FEBS J.* **2009**, *276*, 1291–1306. [[CrossRef](#)]
61. Lee, J.S.; Surh, Y.J. Nrf2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Lett.* **2005**, *224*, 171–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Shin, J.M.; Lee, K.M.; Lee, H.J.; Yun, J.H.; Nho, C.W. Physalin A regulates the Nrf2 pathway through ERK and p38 for induction of detoxifying enzymes. *BMC Complementary Altern. Med.* **2019**, *19*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Bellezza, I.; Mierla, A.L.; Minelli, A. Nrf2 and NF- κ B and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression. *Cancers* **2010**, *2*, 483–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Sisinni, L.; Pietrafesa, M.; Lepore, S.; Maddalena, F.; Condelli, V.; Esposito, F.; Landriscina, M. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in breast cancer: The balance between apoptosis and autophagy and its role in drug resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 857. [[CrossRef](#)]
65. Xu, Z.; Wang, H.; Wei, S.; Wang, Z.; Ji, G. Inhibition of ER stress-related IRE1 α /CREB/NLRP1 pathway promotes the apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cell. *Mol. Immunol.* **2018**, *101*, 377–385. [[CrossRef](#)]
66. Corazzari, M.; Rapino, F.; Ciccocanti, F.; Giglio, P.; Antonioli, M.; Conti, B.; Fimia, G.M.; Lovat, P.E.; Piacentini, M. Oncogenic BRAF induces chronic ER stress condition resulting in increased basal autophagy and apoptotic resistance of cutaneous melanoma. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 946–958. [[CrossRef](#)]
67. Avril, T.; Vauléon, E.; Chevet, E. Endoplasmic reticulum stress signaling and chemotherapy resistance in solid cancers. *Oncogenesis* **2017**, *6*, e373. [[CrossRef](#)]
68. Yoshida, H.; Matsui, T.; Yamamoto, A.; Okada, T.; Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **2001**, *107*, 881–891. [[CrossRef](#)]
69. Caputo, F.; Santini, C.; Bardasi, C.; Cerma, K.; Casadei-Gardini, A.; Spallanzani, A.; Andrikou, K.; Cascinu, S.; Gelsomino, F. BRAF-mutated colorectal cancer: Clinical and molecular insights. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5369. [[CrossRef](#)]
70. Ducreux, M.; Chamseddine, A.; Laurent-Puig, P.; Smolenschi, C.; Hollebecque, A.; Dartigues, P.; Samallin, E.; Boige, V.; Malka, D.; Gelli, M. Molecular Targeted therapy of BRAF-mutant colorectal cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2019**, *11*, 1–15. [[CrossRef](#)]
71. Ventero, M.P.; Fuentes-Baile, M.; Quereda, C.; Perez-Valeciano, E.; Alenda, C.; Garcia-Morales, P.; Esposito, D.; Dorado, P.; Manuel Barbera, V.; Saceda, M. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

CLyTA-DAAO Chimeric Enzyme Bound to Magnetic Nanoparticles. A New Therapeutical Approach for Cancer Patients?

María Fuentes-Baile ¹, Elizabeth Pérez-Valenciano ², Pilar García-Morales ², Camino de Juan Romero ^{1,2}, Daniel Bello-Gil ², Víctor M. Barberá ^{1,3}, Álvaro Rodríguez-Lescure ⁴, Jesús M. Sanz ⁵, Cristina Alenda ⁶ and Miguel Saceda ^{1,2,*}

- ¹ Unidad de Investigación, Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Hospital General Universitario de Elche, Camí de l'Almazara 11, Elche, 03203 Alicante, Spain; fuentes_marbai@gva.es (M.F.-B.); m.juan@umh.es (C.d.J.R.); barbera_vicjua@gva.es (V.M.B.)
 - ² Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Avda, Universidad s/n, Ed. Torregaitán, Elche, 03202 Alicante, Spain; elizabeth.perez@goumh.umh.es (E.P.-V.); pgarcia@umh.es (P.G.-M.); daniel.bello@remabtx.com (D.B.-G.)
 - ³ Unidad de Genética Molecular, Hospital General Universitario de Elche, Camí de l'Almazara 11, Elche, 03203 Alicante, Spain
 - ⁴ Servicio de Oncología, Hospital General Universitario de Elche, Elche, 03203 Alicante, Spain; arodriguez@umh.es
 - ⁵ Centro de Investigaciones Biológicas Margarita Salas (Consejo Superior de Investigaciones Científicas) and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), C/Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain; jmsanz@cib.csic.es
 - ⁶ Unidad de Investigación, Instituto de Investigación Sanitaria y Biomédica de Alicante (ISABIAL), Hospital General Universitario de Alicante, C/Maestro Alonso, 10, 03010 Alicante, Spain; alenda_cri@gva.es
- * Correspondence: msaceda@umh.es; Tel.: +34-966658432



Citation: Fuentes-Baile, M.; Pérez-Valenciano, E.; García-Morales, P.; de Juan Romero, C.; Bello-Gil, D.; Barberá, V.M.; Rodríguez-Lescure, Á.; Sanz, J.M.; Alenda, C.; Saceda, M. CLyTA-DAAO Chimeric Enzyme Bound to Magnetic Nanoparticles. A New Therapeutical Approach for Cancer Patients?. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1477. <https://doi.org/10.3390/ijms22031477>

Academic Editor: Irmgard Tegeder
Received: 31 December 2020
Accepted: 29 January 2021
Published: 2 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: D-amino acid oxidase (DAAO) is an enzyme that catalyzes the oxidation of D-amino acids generating H₂O₂. The enzymatic chimera formed by DAAO bound to the choline-binding domain of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (CLyTA) induces cytotoxicity in several pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cell models. In the current work, we determined whether the effect of CLyTA-DAAO immobilized in magnetic nanoparticles, gold nanoparticles, and alginate capsules offered some advantages as compared to the free CLyTA-DAAO. Results indicate that the immobilization of CLyTA-DAAO in magnetic nanoparticles increases the stability of the enzyme, extending its time of action. Besides, we compared the effect induced by CLyTA-DAAO with the direct addition of hydrogen peroxide, demonstrating that the progressive generation of reactive oxygen species by CLyTA-DAAO is more effective in inducing cytotoxicity than the direct addition of H₂O₂. Furthermore, a pilot study has been initiated in biopsies obtained from pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma patients to evaluate the expression of the main genes involved in resistance to CLyTA-DAAO cytotoxicity. Based on our findings, we propose that CLyTA-DAAO immobilized in magnetic nanoparticles could be effective in a high percentage of patients and, therefore, be used as an anti-cancer therapy for pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma.

Keywords: enzymatic therapy; reactive oxygen species; magnetic nanoparticle; gold nanoparticle; alginate capsules; hydrogen peroxide; oxidative stress; cytotoxicity

1. Introduction

Increasing knowledge of protein immobilization systems has provided the opportunity to increase the usage of enzymes to several areas and expand it to multiple biotechnological processes, since immobilization increases the half-life and reduces protein degradation [1].

The nature of the immobilization material used plays a fundamental role and determines whether the immobilized protein can reach its full therapeutic potential. The immobilization matrix should be made of affordable and available materials and should provide a wide surface area and a high density of functional groups to facilitate enzyme immobilization. In addition, they should guarantee an adequate diffusion of the substrates and products involved in the enzymatic reaction [2].

Nanoparticles are excellent support materials for enzyme immobilization since, in many cases, they produced an increase in catalytic efficiency. Enzyme immobilization in nanoparticles reduces the limitations in the diffusion of substrates and products and increases the functional surface area and the loading capacity [3], which has a direct impact on the activity of the immobilized enzyme. These characteristics, along with their low toxicity and high biocompatibility and biodegradability, have resulted in the increased use of nanoparticles in biomedical research like in diagnostic tests, drug delivery systems, personalized enzyme therapies, and tissue regeneration [4,5].

Nanoparticles can be classified according to their synthesizing material into inorganic (nanocapsules, silica nanoparticles, gold nanoparticles, quantum dots, magnetic nanoparticles, etc.) and organic (liposomes, polymersomes, micelles, polymeric nanoparticles, dendrimers, etc.), providing each type of material advantages and disadvantages [6]. Specifically, magnetic nanoparticles (MNPs) can be manipulated and targeted using magnetic fields. Many MNPs have been used for the immobilization of proteins with good results [3]. These particles have diameters of 5–500 nm and can be synthesized with iron oxides, such as Fe_3O_4 and $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, pure metals such as Fe and Co, and mixtures such as CoPt_3 and FePt [7].

There are several methods to synthesize MNPs: coprecipitation, thermal decomposition, micellar synthesis, hydrothermal synthesis, and laser pyrolysis [7]. After synthesis, magnetic nuclei are protected and stabilized by coating with layers of other compounds to avoid oxidation and decomposition. Normally, the nanoparticle core can be protected with either organic compounds (such as surfactants and polymers) or inorganic compounds (such as silica, carbon, or metals such as Ag and Au) [7]. These coatings not only protect and stabilize the nanoparticle, but also are very frequently used to functionalize the nanomaterial with groups of interest. These possibilities, together with the easy separation and handling, have facilitated their use in biomedical and biotechnological research. They have been applied to protein immobilization and purification, biofuel cells construction, biosensors development, and environmental remediation. In biomedicine, they have been used in applications such as medical equipment development (magnetic resonance imaging) and as drug and gene carriers [3,7–10].

CLytA-DAAO is an enzymatic chimera formed by the union of the choline-binding domain of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (CLytA) from *Streptococcus pneumoniae* with the enzyme D-amino acid oxidase (DAAO) from *Rhodotorula gracilis* [11]. This enzyme oxidizes D-amino acids and, during the reaction, generates hydrogen peroxide as a by-product [12], which is an important inducer of free radicals. The advantage of DAAO over other stress-generating oxidative enzymes, such as glucose oxidase or xanthine oxidase, is that its substrate, D-amino acids, are practically absent in the organism. Thus, the enzyme is not harmful per se and requires the exogenous addition of D-amino acids to be catalytically active [13–15]. Previously, we demonstrated the cytotoxic capacity of the enzymatic chimera CLytA-DAAO activated by D-Alanine (D-Ala) in pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell lines [11]. The therapeutic strategy that we propose is based on targeting the enzyme to the tumor area with an external magnetic field in order to concentrate the nanoparticles in the tumor, and then treating the patients systemically with D-amino acids.

The CLytA domain would allow one to immobilize the enzyme in nanoparticles that contain choline or derivatives such as diethylaminoethanol (DEAE) on the surface. In fact, our magnetic nanoparticles have a magnetite core and a DEAE-functionalized starch shell.

Although we demonstrated the cytotoxicity induced by CLytA-DAAO in many pancreatic and colorectal carcinoma and glioblastoma cellular models, we found two cell lines resistant to cell death induced by this treatment: Hs766T from pancreatic carcinoma and HT-29 from colorectal carcinoma [11]. Hs766T resistance to CLytA-DAAO-induced cell death was found to be related to the high expression of antioxidant proteins such as catalase and nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and proteins involved in the inflammatory and stress response such as nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and p38 mitogen-activated protein kinase 11 (p38). Regarding HT-29 resistance to CLytA-DAAO-induced cell death, it is mediated by glutathione peroxidase 2 (GPX2), an antioxidant protein, but also by NF- κ B and p38 [16].

The current article evaluates the possible benefits of CLytA-DAAO immobilization in MNPs, focused on demonstration that the cytotoxic capacities of CLytA-DAAO and D-Ala treatment are determined by the progressive induction of oxidative stress. Furthermore, in order to estimate the putative effectiveness of CLytA-DAAO and D-Ala as antitumor treatment in patients, a pilot study has been initiated to find out the general expression of the main genes involved in resistance to CLytA-DAAO in biopsies obtained from patients with pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma or glioblastoma.

2. Results

2.1. The Cytotoxic Effect of CLytA-DAAO Is Higher When It Is Bound to Magnetic Nanoparticles than When It Is Immobilized in Gold Nanoparticles or Alginate Capsules

In order to compare the CLytA-DAAO effect, either free or immobilized in different immobilization supports, the percentage of cell death produced by the different treatments was determined in the IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, a well-established CLytA-DAAO sensitive cellular model. The enzyme was used free, immobilized in MNPs, in gold nanoparticles (GNPs), or in alginate capsules. A significantly higher percentage of cell death was observed with CLytA-DAAO bound to MNPs in comparison with the free enzyme. However, immobilization in GNPs and in alginate capsules significantly decreased the cell death induced by the treatment (Figure 1A), suggesting that these methods of CLytA-DAAO immobilization are less effective stabilizing the chimeric enzyme than MNPs. We had previously shown that the CLytA-DAAO-bound to MNPs together with D-Ala treatment induces a higher percentage of cells in subG1 phase than the free enzyme in several pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell lines [11]. Here, a series of cell viability analyses were performed to confirm that, in fact, CLytA-DAAO bound to MNPs induced a significantly higher percentage of cell death compared to the free enzyme in all cancer models tested. Figure 1B shows a representative image in SW-480 colorectal carcinoma cell line and in HGUE-GB-18 and HGUE-GB-37 glioblastoma cell lines.

To demonstrate that the higher cell death effect was due to a greater effectiveness of the treatment and not to a possible toxicity derived from MNPs, cell proliferation assays (Figure 1C) and cell cycle analysis (Figure 1D) were performed. For these experiments, we used CLytA-DAAO immobilized in MNPs, in the absence of D-Ala, the substrate of the enzyme. Both assays were carried out on IMIM-PC-2 cell line, and no significant changes were observed with respect to the control. These data demonstrate that MNPs are not toxic per se and, therefore, the greater cell death observed with the enzyme immobilized in MNPs with respect to that observed with free CLytA-DAAO (Figure 1A,B) is due to MNPs immobilization. Taking together these results indicates that CLytA-DAAO immobilized in MNPs improves the effectiveness of the treatment.

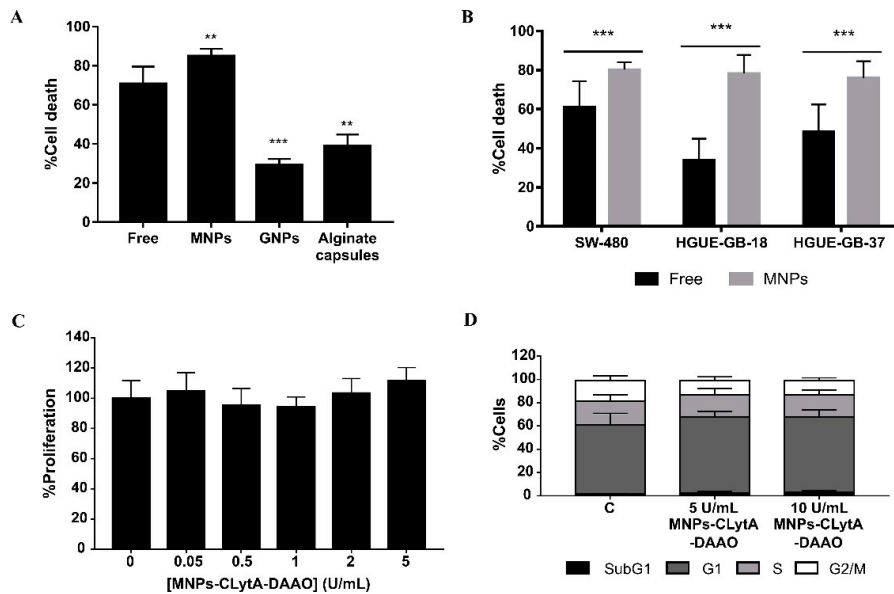


Figure 1. Cell death induced by CLytA-DAAO free, immobilized in magnetic nanoparticles (MNPs), in gold nanoparticles (GNPs), and immobilized in alginate capsules. **(A)** IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line was treated with 2 U/mL CLytA-DAAO, free or immobilized in MNPs, GNPs or alginate capsules, and 1 mM D-Ala for 24 h. **(B)** SW-480 colorectal carcinoma cell line and HGUE-GB-18 and HGUE-GB-37 glioblastoma cell lines were treated with 2 U/mL CLytA-DAAO, free or immobilized in MNPs, and 1 mM D-Ala for 24 h. Cell viability was determined using Muse cell analyzer. Graphs represent cell death percentage (mean \pm SD) after subtracting cell death in the control untreated ($n \geq 3$). **(C)** IMIM-PC-2 cell line was treated with CLytA-DAAO bound to MNPs in a concentration range between 0.05–5 U/mL for 72 h. Graph shows the proliferation percentage \pm SD normalized with respect to the control untreated ($n \geq 6$). **(D)** IMIM-PC-2 cell line was treated with 5 or 10 U/mL CLytA-DAAO immobilized in magnetic nanoparticles for 24 h and the cell distribution in each phase of cell cycle was determined by flow cytometry. Graph shows the cell percentage in each phase of cell cycle (mean \pm SD) ($n \geq 3$). ** Indicates a p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001 .

2.2. The IC₅₀ Value for the Enzyme Immobilized in MNPs Is Lower than for the Free Enzyme

To obtain IC₅₀ values of CLytA-DAAO, free, and bound to MNPs, MTT assays were performed. Figure 2 shows the results obtained after 72 h treatment in IMIM-PC-2 and RWP-1 pancreatic carcinoma cell lines, SW-480 and SW-620 colorectal carcinoma cell lines, and HGUE-GB-18 and HGUE-GB-37 glioblastoma cell lines. In all cell lines, a stronger effect was generally observed with CLytA-DAAO bound to MNPs in comparison to free enzyme, although the differences were more evident in glioblastoma cell lines than in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines.

Table 1 shows IC₅₀ values obtained with the enzyme, either free or immobilized in MNPs, in several pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell lines. In addition, for a better visualization of the results, the anti-proliferative percentages obtained using 0.025 and 0.25 U/mL of free and immobilized CLytA-DAAO are included.

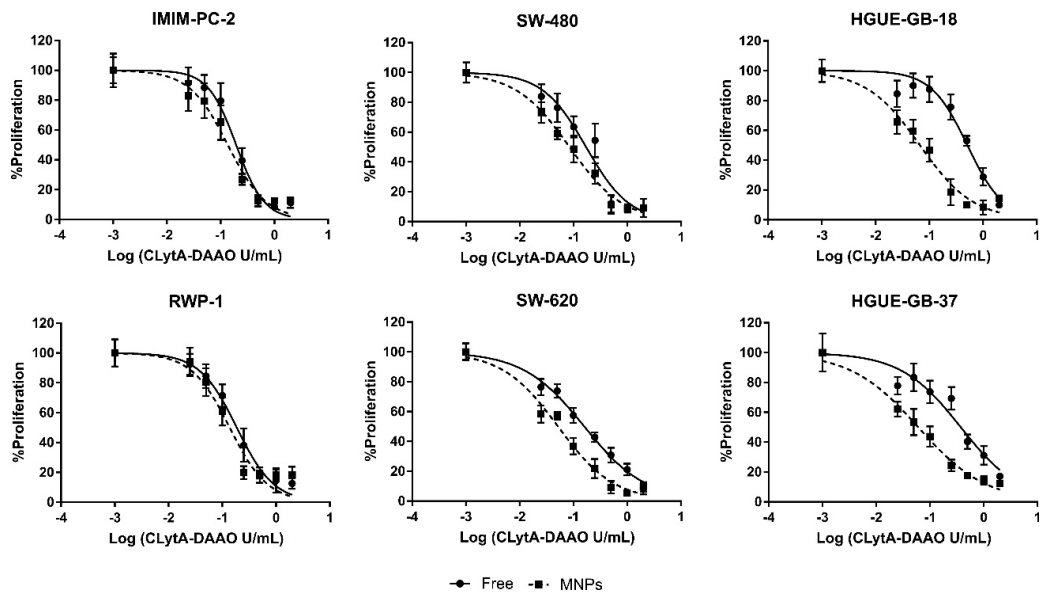


Figure 2. Anti-proliferative effect of CLytA-DAAO, free and bound to MNPs, on pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell lines. Cells were treated with CLytA-DAAO, free or immobilized, in a concentration range between 0.025–2 U/mL and 1 mM D-Ala for 72 h and cell proliferation was determined by MTT assay. Graph shows the proliferation percentage \pm SD respect to control untreated versus the logarithm of the concentration ($n \geq 6$).

Table 1. Anti-proliferative percentage of 0.025 U/mL and 0.25 U/mL CLytA-DAAO, free or bound to MNPs, with 1 mM D-Ala and IC50 value on pancreatic carcinoma (PC), colorectal carcinoma (CRC), and glioblastoma (GBM) cell lines. Cells were treated with a concentration range between 0.025–2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 72 h.

Origin	Cell Line	%Inhibition (0.025 U/mL)		%Inhibition (0.25 U/mL)		IC50 (U/mL)	
		Free	MNPs	Free	MNPs	Free	MNPs
PC	IMIM-PC-2	8.6 \pm 10.5	17.0 \pm 10.1	60.5 \pm 8.5	73.4 \pm 3.5	0.19 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02
	RWP-1	7.5 \pm 6.9	5.9 \pm 9.5	61.8 \pm 11.1	80.2 \pm 4.3	0.19 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03
	Hs766T	33.8 \pm 14.4	47.7 \pm 3.1	62.7 \pm 13.5	62.5 \pm 14.6	0.10 \pm 0.02	0.05 \pm 0.02
CRC	SW-480	16.1 \pm 8.1	26.9 \pm 6.9	45.6 \pm 11.3	67.7 \pm 7.0	0.17 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01
	SW-620	23.6 \pm 5.4	41.7 \pm 5.8	57.3 \pm 3.3	78.1 \pm 6.4	0.16 \pm 0.02	0.05 \pm 0.01
	HT-29	0.0 \pm 5.6	33.9 \pm 8.5	22.4 \pm 8.1	64.9 \pm 8.1	0.68 \pm 0.10	0.10 \pm 0.02
GBM	HGUE-GB-18	15.4 \pm 8.9	34.3 \pm 7.9	24.4 \pm 8.4	81.4 \pm 8.7	0.50 \pm 0.08	0.07 \pm 0.01
	HGUE-GB-37	22.2 \pm 5.8	37.8 \pm 4.9	30.7 \pm 7.6	75.7 \pm 3.9	0.38 \pm 0.06	0.07 \pm 0.01
	HGUE-GB-39	35.8 \pm 7.9	50.1 \pm 1.5	41.0 \pm 8.4	81.2 \pm 4.5	0.27 \pm 0.06	0.03 \pm 0.01
	HGUE-GB-42	7.8 \pm 6.4	30.8 \pm 6.1	26.9 \pm 9.0	72.9 \pm 7.1	0.54 \pm 0.05	0.08 \pm 0.01

The differences observed between free and immobilized in MNPs enzyme in viability (Figure 1A,B) and cell cycle analysis [11], were more pronounced than those observed in the MTT assays in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. The viability and cell cycle studies were conducted after 24 h treatment, whereas the MTT assays were carried out after 72 h treatment. To match these conditions, the MTT assays were repeated with a CLytA-DAAO, either free or bound to MNPs, and D-Ala treatment for 24 h in pancreatic carcinoma (IMIM-PC-2 and RWP-1) and in colorectal carcinoma (SW-480 and SW-620 cell lines). It was observed that reducing the treatment time to 24 h, the difference between using the enzyme, free or immobilized in MNPs get increased (Figure 3). The IC50 values obtained with CLytA-DAAO, either free or bound to MNPs, are shown in Table 2.

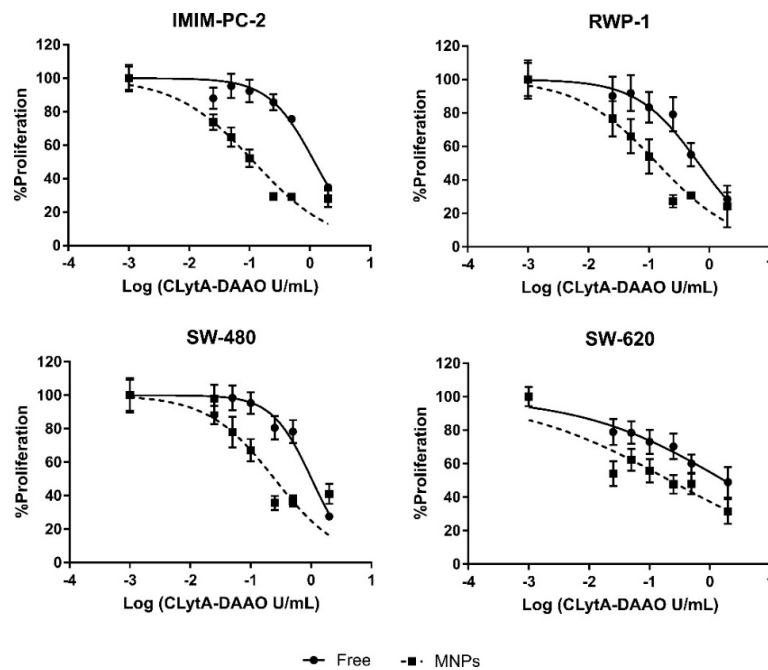


Figure 3. Anti-proliferative effect of CLytA-DAAO, free and bound to MNPs, on pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. Cells were treated with CLytA-DAAO, free or immobilized, in a concentration range between 0.025–2 U/mL and 1 mM D-Ala for 24 h and cell proliferation was determined by MTT assay. Graph shows the proliferation percentage \pm SD respect to control untreated versus the logarithm of the concentration ($n \geq 6$).

Table 2. IC₅₀ value of CLytA-DAAO, free and bound to MNPs, on pancreatic and colorectal carcinoma cell lines. Cells were treated with a concentration range between 0.025–2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 24 h.

Cell Line	IC ₅₀ (U/mL)	
	Free	MNPs
IMIM-PC-2	1.26 \pm 0.17	0.11 \pm 0.03
RWP-1	0.70 \pm 0.08	0.12 \pm 0.02
SW-480	1.12 \pm 0.21	0.24 \pm 0.08
SW-620	0.78 \pm 0.30	0.17 \pm 0.08

2.3. The Greater Effect Induced by the Treatment with CLytA-DAAO Bound to MNPs Is Due to an Increase in the Enzyme Stability

The cell death induced by CLytA-DAAO and D-Ala treatment is due to the H₂O₂ production during the oxidation reaction catalyzed by CLytA-DAAO. In fact, we have previously reported that during the first two hours of treatment, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels increased in all cell lines sensitive to CLytA-DAAO-induced cell death [11].

ROS are responsible for the cell death induced by CLytA-DAAO treatment. To evaluate whether the enzyme bound to MNPs is able to increase free radical levels, we used IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, SW-480 colorectal carcinoma cell line, and HGUE-GB-37 glioblastoma cell line. Cells were treated for a time range of 20–120 min with 2 U/mL CLytA-DAAO, either free or immobilized in MNPs, together with 1 mM D-Ala, and the ROS levels were determined with the fluorescent probe DCFH₂-DA. In the three cell lines studied, an increase in free radicals was observed depending on the treatment time, without major differences when using free or immobilized CLytA-DAAO (Figure 4). Consequently,

the level of ROS reached after each treatment is not the reason that accounted for the difference between cell death levels observed using free or immobilized enzyme.

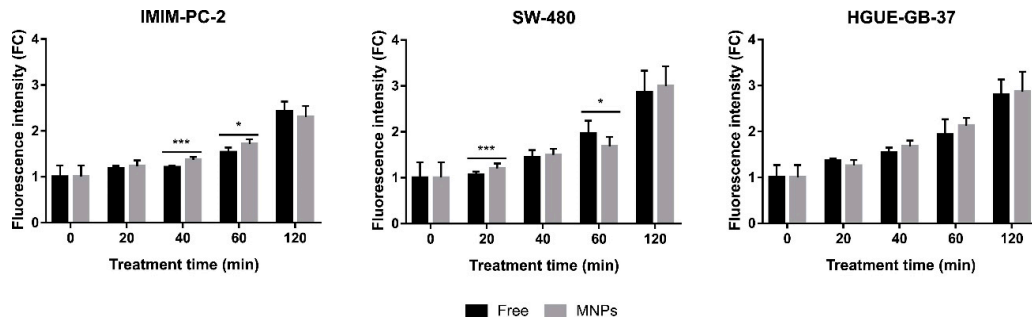


Figure 4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) increase after CLytA-DAAO, free and bound to MNPs, and D-Ala treatment in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, SW-480 colorectal carcinoma cell line, and HGUE-GB-37 glioblastoma cell line. Cells were treated with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for 20–120 min. Free radical production was determined through DCFH₂-DA probe and each treatment time had a control untreated that only contained the probe. Graph shows the fold change (FC) ± SD of fluorescent intensity with respect to the control ($n \geq 6$). * Indicates a p -value < 0.05 and *** < 0.001.

To determine whether the increase in cell death produced by the immobilized enzyme as compare to that produced by the free enzyme was due to a faster effect of CLytA-DAAO bound to MNPs than of free CLytA-DAAO, the IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma, SW-480 colorectal carcinoma, and HGUE-GB-18 glioblastoma cell lines were analyzed. The three cell models were treated with 2 U/mL CLytA-DAO, either free or immobilized in MNPs, and 1 mM D-Ala for different times between 15 and 60 min. Then, the culture medium was replaced, withdrawing the treatment, and the cells were incubated for 24 h to analyze the cell cycle distribution by flow cytometry.

It should be noted that in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines, an initial cytostatic effect of the enzyme was observed, blocking the cells in the G2/M phase, while in the glioblastoma cell line, the effect was exclusively cytotoxic (Figure 5). This result agrees with previous data showing that CLytA-DAAO induces cell death by a different mechanism depending on the tumor model. A traditional apoptosis was described in glioblastoma cell lines, whereas pancreatic and colorectal carcinoma cell lines displayed a necrotic-like cell death [11,16]. The results showed slight changes between the immobilized and free CLytA-DAAO, suggesting that CLytA-DAAO bound to MNPs acts faster than free CLytA-DAAO. However, the differences were not statistically significant in most cases (Figure 5). The same effects were observed in other pancreatic and colorectal carcinoma cell lines (Supplementary Materials Figure S1).

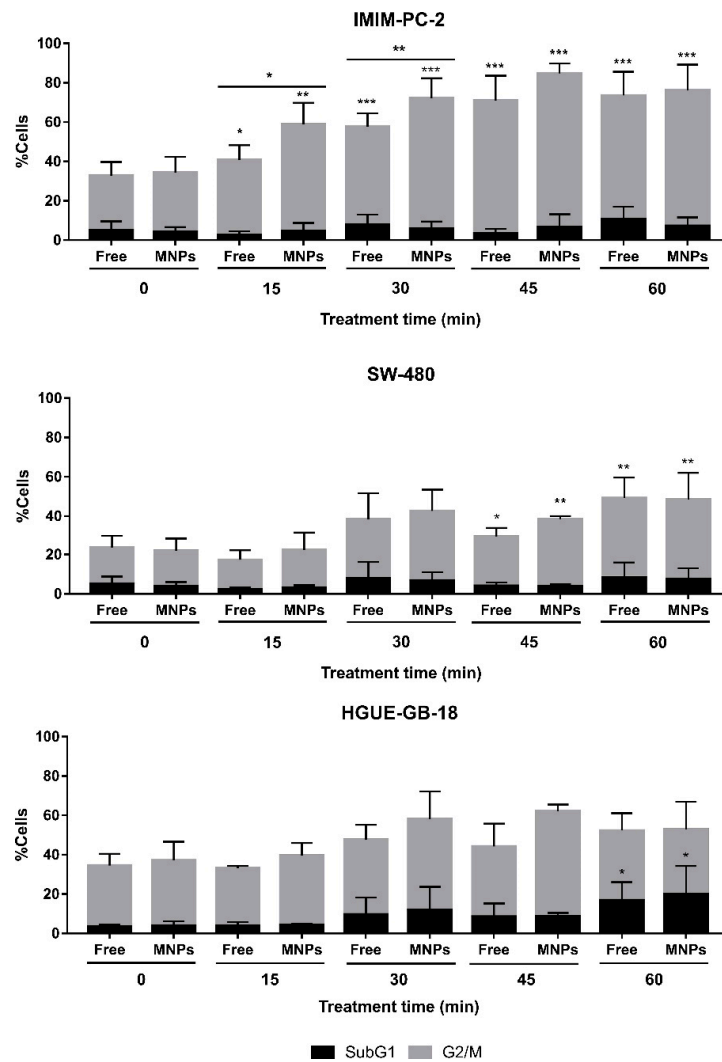


Figure 5. Cells accumulation in subG1 and G2/M phases after a CLytA-DAAO, free or bound to MNPs, and D-Ala treatment in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, SW-480 colorectal carcinoma cell line, and HGUE-GB-18 glioblastoma cell line. Cells were treated with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala for a short time (15–60 min) and then, treatment was removed, replacing the medium. Cells were incubated until 24 h from the treatment addition were completed. Graph shows the percentage of cells \pm SD in subG1 and G2/M phases ($n \geq 3$). * Indicates a p -value < 0.05 , ** < 0.01 and *** < 0.001 .

Finally, since CLytA-DAAO is a yeast enzyme and its optimum temperature is 25 °C, the stability of the enzyme at 37 °C was determined in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma, SW-480 colorectal carcinoma, and HGUE-GB-18 glioblastoma cell lines. To analyze the stability, CLytA-DAAO either free or immobilized in MNPs was incubated at 37 °C for 0.5, 1, 2, and 3 h before being added to the cells with D-Ala. Then, the treatment was maintained for 24 h and cell viability was studied. Results show statistically significant differences between the two conditions (Figure 6). CLytA-DAAO bound to MNPs maintained the cell death effect for a longer time than in its free state, which indicates that the immobilization in MNPs substantially improves the stability of the enzyme at 37 °C.

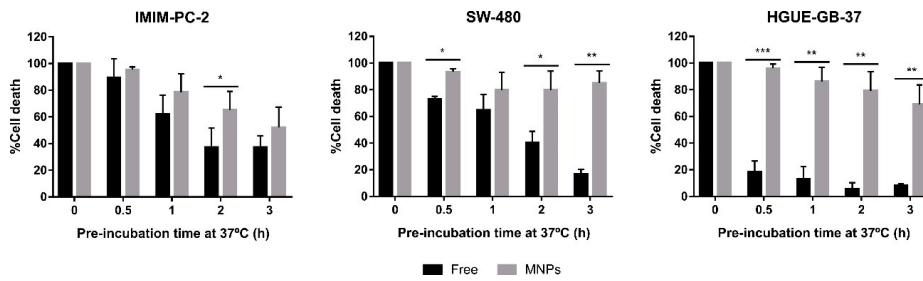


Figure 6. Cell death induced by CLyTA-DAAO, free and bound to MNPs, and D-Ala after incubation of the enzyme at 37 °C in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, SW-480 colorectal carcinoma cell line, and HGUE-GB-37 glioblastoma cell line. Cells were treated with 2 U/mL CLyTA-DAAO and 1 mM D-Ala for 24 h. The CLyTA-DAAO used was pre-incubated at 37 °C for 30 min, 1, 2, and 3 h before adding it to the cells. Graph shows the percentage of cell death normalizing the treatment with CLyTA-DAAO without pre-incubation as 100% \pm SD ($n \geq 3$). * Indicates a p -value < 0.05, ** < 0.01 and *** < 0.001.

2.4. CLyTA-DAAO Can Be Released from MNPs Through the External Addition of Choline

An advantage of our system is that CLyTA-DAAO immobilization in MNPs is carried out by the affinity of the CLyTA domain for choline and derivatives such as DEAE, which is used in this case to functionalize the MNPs [17,18]. The main advantage of this type of immobilization is that the process is very simple and reversible.

To evaluate the possibility of releasing the enzyme from MNPs, MTT assays were initially performed to verify the toxicity of choline. Increasing doses of choline were added to the SW-480 colorectal carcinoma cell line for 72 h, and only the 100 mM concentration decreased cell proliferation (Figure 7A). Next, additional MTT assays were carried out combining CLyTA-DAAO, D-Ala and choline under different conditions. 2 U/mL CLyTA-DAAO, either free or bound to MNPs, were added in combination with 1 mM D-Ala and different concentrations of choline (0.1, 1, and 50 mM). In addition, CLyTA-DAAO bound to MNPs was pre-incubated with choline (0.1, 1, and 50 mM) for 10 min and the released CLyTA-DAAO was removed with the aid of an external magnet. The enzyme that remained immobilized in the MNPs was added to cells. CLyTA-DAAO, either free or immobilized in MNPs, maintained its maximum effect with the different doses of choline added (Figure 7B). On the other side, treatment of cells with the enzyme that had been pre-incubated with choline, shows a significant decrease in the anti-proliferative effect dependent on the dose of choline was observed (Figure 7B).

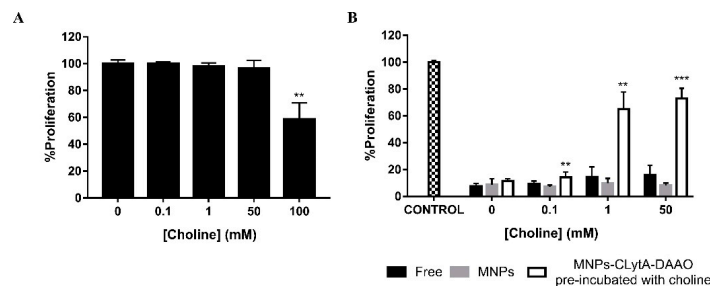


Figure 7. CLyTA-DAAO release from MNPs through the choline addition. (A) SW-480 cell line was treated with 1–100 mM choline for 72 h and cell proliferation was determined by MTT assay. (B) SW-480 cell line was treated with 2 U/mL CLyTA-DAAO, 1 mM D-Ala and increasing concentrations of choline (0.1–50 mM) for 72 h and cell proliferation was determined by MTT assay. The CLyTA-DAAO enzyme was used: free and bound to MNPs in combination with choline and bound to MNPs after a pre-incubation with choline for 10 min. Graphs show the proliferation percentage \pm SD respect to control untreated ($n \geq 6$). ** Indicates a p -value < 0.01 and *** < 0.001.

2.5. CLytA-DAAO and D-Ala Induce Cell Death in a Different Way than Direct H₂O₂ Addition

As mentioned above, cell death induced by CLytA-DAAO and D-Ala is supposed to be caused by the H₂O₂ production, which leads to increased ROS levels within the cells causing death. In order to check whether CLytA-DAAO and D-Ala treatment are equivalent to add directly H₂O₂ to cells, MTT assays were performed. We used increasing doses of H₂O₂ in a range between 50 and 600 μ M in pancreatic, colorectal, and glioblastoma tumor cell lines. A concentration-dependent anti-proliferative effect in all cell lines tested can be seen (Figure 8A–C). Table 3 shows the IC₅₀ values for the H₂O₂ treatment. Results showed different sensitivity patterns compared to CLytA-DAAO and D-Ala treatment. IMIM-PC-2 and RWP-1 pancreatic carcinoma cell lines, as well as SW-480 and SW-620 colorectal carcinoma cell lines showed similar sensitivity levels under CLytA-DAAO and D-Ala treatment. However, IMIM-PC-2 and SW-620 seem to be more resistant to H₂O₂ treatment than RWP-1 and SW-480. Finally, both glioblastoma cell lines appear to be quite resistant to H₂O₂ treatment, with HGUE-GB-37 cell line being the most resistant of all cell lines.

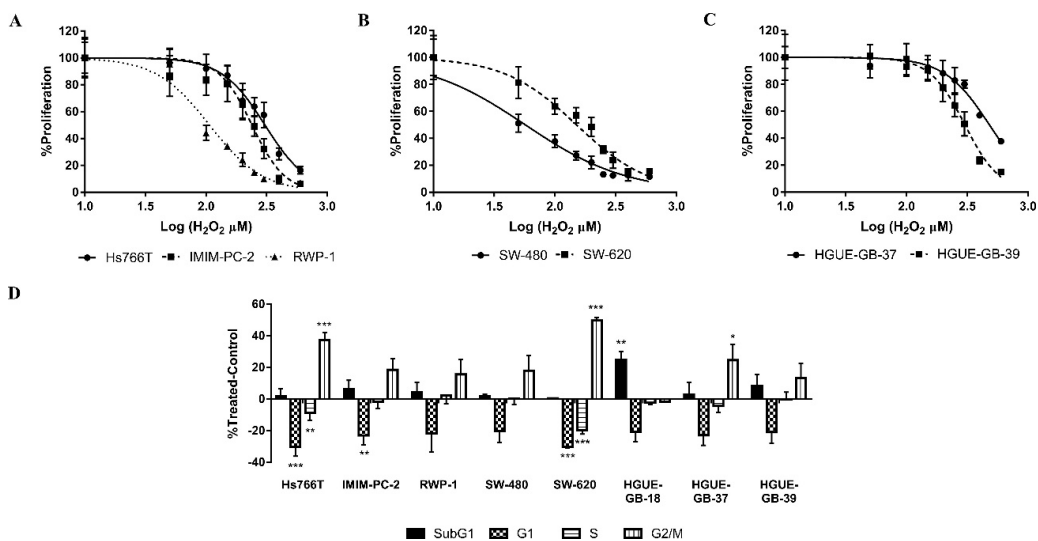


Figure 8. H₂O₂ effect in pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell models. H₂O₂ anti-proliferative effect induced in pancreatic carcinoma (A), colorectal carcinoma (B) and glioblastoma (C) cell lines. Cells were treated with H₂O₂ in a concentration range between 50–600 μ M for 72 h and cell proliferation was determined by MTT assay. Graph shows the proliferation percentage \pm SD respect to control untreated versus the logarithm of the concentration ($n \geq 6$). (D) Variations in cell cycle distribution after H₂O₂ treatment in Hs766T, IMIM-PC-2, and RWP-1 pancreatic carcinoma cell lines, SW-480 and SW-620 colorectal carcinoma cell lines and HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, and HGUE-GB-39 glioblastoma cell lines. Cells were treated with 600 μ M H₂O₂ for 24 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Graph shows the cells percentage \pm SD in each phase of cell cycle after subtracting the cells percentage in the control untreated ($n \geq 3$). * Indicates a p -value < 0.05 , ** < 0.01 and *** < 0.001 .

Next, cell cycle analyses were performed after 600 μ M H₂O₂ treatment for 24 h to study the cell death effect. Results showed important differences with respect to the treatment with CLytA-DAAO and D-Ala. In IMIM-PC-2 and RWP-1 pancreatic carcinoma cell lines as well as in SW-480 and SW-620 colorectal carcinoma cell lines, the treatment with 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala produces a markedly cytotoxic effect (data not shown). In contrast, in IMIM-PC-2, RWP-1 and SW-480 cell lines, treatment with H₂O₂ induced a lighter effect as compared to the observed with CLytA-DAAO, showing a small increase in the percentage of cells in subG1 and G2/M phases with respect to the control (Figure 8D). Curiously, SW-620 did not show an increase in the percentage of dead cells, but the effect caused by H₂O₂ was cytostatic, increasing the percentage of cells in the G2/M phase to $49.6 \pm 2.12\%$ with respect to the control (Figure 8D). Hs766T pancreatic carcinoma cell

line was resistant to cell death induced by CLytA-DAAO and D-Ala, with an increase in subG1 phase of $6.81 \pm 5.21\%$ (data not shown). However, a pronounced increase in the percentage of cells in G2/M phase was observed after H₂O₂ treatment (Figure 8D). Finally, in glioblastoma cell models the changes in cell cycle distribution were also lower than the observed with CLytA-DAAO and D-Ala treatment. Only HGUE-GB-18 showed an increase in the subG1 phase very similar to that observed with CLytA-DAAO in previous studies (Figure 8D).

Table 3. IC50 value of H₂O₂ on pancreatic carcinoma (PC), colorectal carcinoma (CRC) and glioblastoma (GBM) cell lines. Cells were treated with a concentration range between 50 and 600 μ M H₂O₂ for 72 h.

Origin	Cell Line	IC50 (μ M)
PC	Hs766T	358.0 ± 76.5
	IMIM-PC-2	222.1 ± 55.9
	RWP-1	83.71 ± 1.92
CRC	SW-480	54.1 ± 2.77
	SW-620	145.3 ± 17.0
GBM	HGUE-GB-37	776.6 ± 157.5
	HGUE-GB-39	362.3 ± 95.5

These analyses were repeated, evaluating the percentage of cell death through the plasmatic membrane rupture by a viability assay. In all cell lines, the percentage of cell death was less than 15%, although RWP-1 pancreatic carcinoma cells and SW-480 colorectal carcinoma cells suffered a higher percentage of cell death (Figure 9A). Therefore, with H₂O₂ treatment, the percentage of cell death did not reach the levels observed with CLytA-DAAO and D-Ala treatment in any of the cell lines tested.

One of the main questions raised by these findings is whether the G2/M blockade observed in Hs766T eventually turned into cell death. To address this, cell cycle analyses were repeated using 48 and 72 h treatment. In addition, we included IMIM-PC-2 cell line to find out whether a longer treatment was necessary to obtain similar results to those observed with CLytA-DAAO and D-Ala treatment. Hs766T maintained the G2/M phase blockade up to 72 h of H₂O₂ treatment (Figure 9B). On the contrary, 72 h of treatment with H₂O₂ were enough to observe a significant increase in the percentage of cells in subG1 phase, corresponding to dead cells, in the IMIM-PC-2 cell line (Figure 9B). However, none of these conditions reached the level of cytotoxicity generated by CLytA-DAAO and D-Ala treatment.

Cell death induced by CLytA-DAAO is due to a progressive increase in the ROS levels inside the cells. Therefore, ROS produced by the treatment with H₂O₂ were determined in IMIM-PC-2 cell line. After two hours of treatment with CLytA-DAAO, ROS levels increased 2.43 ± 0.21 times with respect to the control (Figure 4), and 40 min after H₂O₂ addition, the maximum ROS levels were reached (5.45 ± 0.32) with a subsequent decrease (Figure 9C). This observation indicates that addition of CLytA-DAAO and D-Ala results in a progressive increase of ROS, but the time conditions used in this treatment are not optimal to observe the maximum effect. Instead, H₂O₂ treatment leads to faster ROS levels increase that is followed by a decrease. In the HGUE-GB-37 cell line, these decreases in ROS levels were also observed after two hours of H₂O₂ treatment (Figure 9C). Surprisingly, two hours of treatment in SW-480 were not enough to observe the decrease of ROS (Figure 9C). In conclusion, cell death induced by CLytA-DAAO and D-Ala is due to a progressive and sustained in time increase in ROS levels. The differential effects observed between H₂O₂ and CLytA-DAAO treatment are graphically summarized in Supplementary Materials Figure S2.

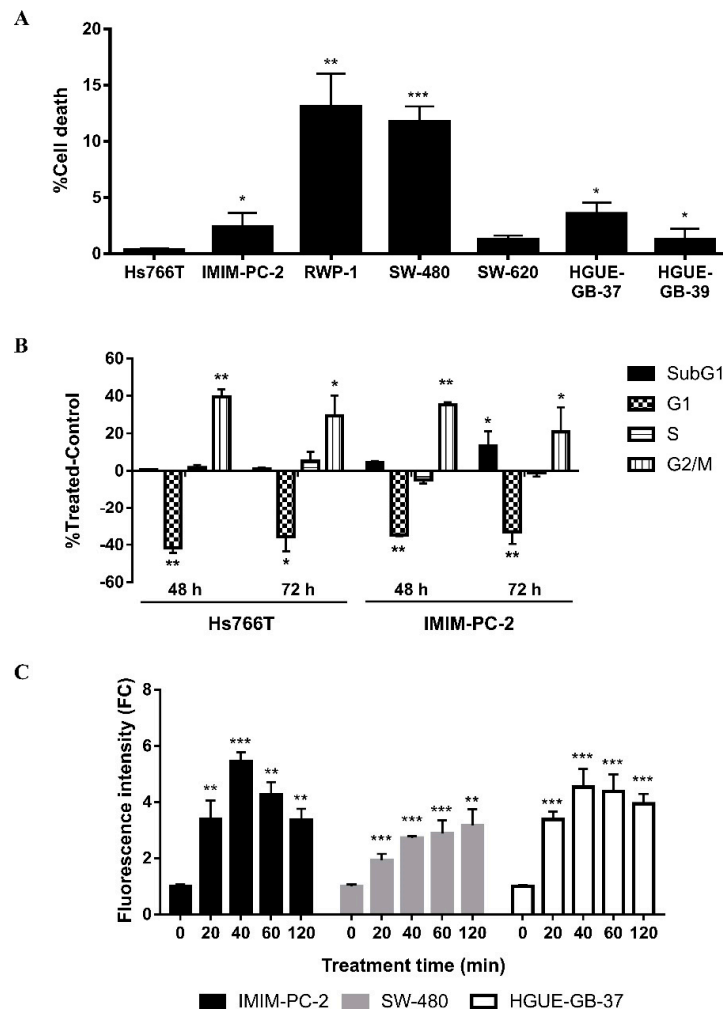


Figure 9. Differential effect of H_2O_2 with respect to CLytA-DAAO and D-Ala treatment. **(A)** Plasmatic membrane rupture induced by H_2O_2 in Hs766T, IMIM-PC-2, and RWP-1 cell lines from pancreatic carcinoma, SW-480 and SW-620 cell lines from colorectal carcinoma and HGUE-GB-37 and HGUE-GB-39 cell lines from glioblastoma. Cells were treated with $600 \mu M H_2O_2$ for 24 h and cell viability was determined using Muse cell analyzer. Graph represents cell death percentage (mean \pm SD) after subtracting cell death in the control untreated ($n \geq 3$). **(B)** Variations in cell cycle distribution after H_2O_2 treatment for 48 and 72 h. Hs766T and IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell lines were treated with $600 \mu M H_2O_2$ for 48 and 72 h and cell cycle distribution was determined by flow cytometry. Graph shows the cells percentage \pm SD in each phase of cell cycle after subtracting the cells percentage in the control untreated ($n \geq 3$). **(C)** Intracellular ROS increase after H_2O_2 treatment in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, SW-480 colorectal carcinoma cell line and HGUE-GB-37 glioblastoma cell line. Cells were treated with $600 \mu M H_2O_2$ for 20–120 min. Free radical production was determined through DCFH₂-DA probe and each treatment time had a control untreated that only contained the probe. Graph shows the fold change (FC) \pm SD of fluorescent intensity with respect to the control ($n \geq 6$). * Indicates a p -value < 0.05 , ** p -value < 0.01 and *** p -value < 0.001 .

2.6. Expression of Genes Involved in Resistance to CLytA-DAAO-Induced Cell Death in Patient Samples

The resistance mechanisms against CLytA-DAAO-induced cell death in Hs766T cell line from pancreatic carcinoma and in HT-29 cell line from colorectal carcinoma were

determined in our previously published article. Resistance mechanisms were related to the expression of some genes involved in the response to oxidative stress and cell survival [16].

The expression of three of the main genes involved in the resistance to CLytA-DAAO treatment was analyzed in biopsies from patients with pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma. However, given the reduced number of biopsies obtained until now, we have complemented the analysis using UALCAN database. This web portal allows analysis of gene expression and survival in different types of tumors using data extracted from “the Cancer Genome Atlas” project [19].

Catalase (*CAT*) is one of the main genes over-expressed in Hs766T and involved in resistance against CLytA-DAAO-induced cell death. *CAT* expression in the rest of pancreatic carcinoma (IMIM-PC-2 and RWP-1), colorectal carcinoma (HT-29, SW-480, and SW-620) and glioblastoma (HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, and HGUE-GB-42) cell lines were more than 80% lower than that observed in Hs766T (Figure 10A). Besides, Figure 10A shows the *CAT* expression in patient biopsies: in pancreatic carcinoma biopsies is in the range of 0.22%–3.62% with respect to that observed in Hs766T, in colorectal carcinoma between 0.79%–6.35% and in glioblastoma between 1.14%–10.1%. This expression levels were more similar to the observed in sensitive cell lines ranged between 5.5%–20% with respect to the *CAT* expression in Hs766T (Figure 10A). In the UALCAN analysis, a similar *CAT* expression among pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma patients was observed (Supplementary Materials Figure S3A). Only, in patients with colon adenocarcinoma, *CAT* expression is significantly lower than in normal tissue (Supplementary Materials Figure S3A), although this does not seem to affect survival [19].

Another gen involved in the resistance of Hs766T to cell death induced by CLytA-DAAO is *NFE2L2*, which encodes the Nrf2 transcription factor. The *NFE2L2* expression in pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell lines was between 29%–73.7% with respect to the observed in Hs766T (Figure 10B). In the patient biopsies, the *NFE2L2* expression was highly variable. Biopsies from pancreatic carcinoma patients maintained an expression lower than 15% with respect to the expression observed in Hs766T. A similar result was obtained in colorectal carcinoma patients, with one exception, where *NFE2L2* expression was $61.36\% \pm 13.2\%$ with respect to Hs766T expression (Figure 10B). *NFE2L2* expression in pancreatic and colorectal carcinoma cell lines was comprised between 29%–58% with respect to the observed in Hs766T (Figure 10B), thus the average percentage of expression in patients is significantly lower than the observed in sensitive cell lines. However, in glioblastoma biopsies, six samples showed an expression lower than 15%, three of them had $36.41\% \pm 14.66\%$, $88.95\% \pm 16.27\%$, and $183.74\% \pm 19.4\%$, and there was one biopsy whose expression was $1246.81\% \pm 171.47\%$ with respect to Hs766T (Figure 10B). In the glioblastoma cell lines, the *NFE2L2* expression levels ranged between 30%–73.7% with respect to the observed in Hs766T (Figure 10B).

Survival analysis performed with UALCAN showed that a high *NFE2L2* expression in pancreatic carcinoma patients has a correlation with poor prognosis (p -value: 0.023), while in colorectal carcinoma and glioblastoma patients, no significant changes were observed in survival analysis (data not shown). On the other hand, colorectal carcinoma patients presented a lower *NFE2L2* expression with respect to the healthy tissue, while glioblastoma patients have a higher expression in comparison with healthy brain tissue samples (Supplementary Materials Figure S3B). However, similar to *CAT*, there were no differences in expression between pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma patients (Supplementary Materials Figure S3B).

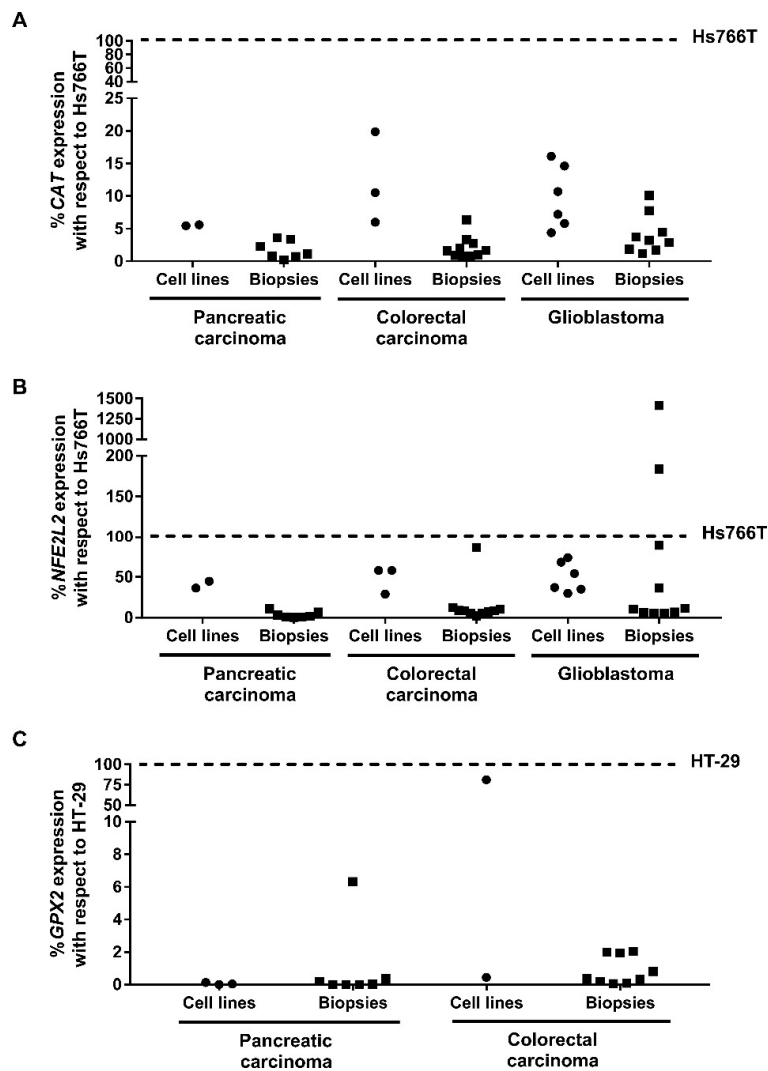


Figure 10. Gene expression in cell lines and patient biopsies from pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma. Graphs show the expression percentage of *CAT* (A), *NFE2L2* (B), and *GPX2* (C). *CAT* and *NFE2L2* expression are normalized with respect to the expression observed in Hs766T pancreatic carcinoma cell line and *GPX2* is normalized with the expression observed in HT-29 colorectal carcinoma cell line ($n \geq 3$).

A high expression of *GPX2* was related with the cell death resistance observed in HT-29 colorectal carcinoma cell line. *GPX2* expression in pancreatic carcinoma cell lines was in the range 0.005–0.120% with respect to HT-29 expression (Figure 10C). However, in glioblastoma cell lines, there was no expression of *GPX2*. Regarding the expression obtained in biopsies, six of the pancreatic carcinoma patients and six of the colorectal carcinoma patients showed expression levels similar to those observed in pancreatic carcinoma cell lines and in SW-480 colorectal carcinoma cell line, lower than 0.5% with respect to the expression in HT-29 (Figure 10C). The highest expression was observed in one of the pancreatic carcinoma biopsies, with $6.32\% \pm 0.79\%$ with respect to HT-29 and, the remaining four colorectal carcinoma biopsies were between 0.8%–2.03% (Figure 10C). In contrast, no *GPX2* expression was observed in any of the glioblastoma biopsies.

In the analysis performed in UALCAN, the highest *GPX2* expression occurred in colorectal carcinoma patients, followed by pancreatic carcinoma patients, in which *GPX2*

expression is approximately 85% with respect to the expression observed in colorectal carcinoma. In glioblastoma patients, the expression was around 0.6% with respect to the observed in colorectal carcinoma (Supplementary Materials Figure S3C). The expression in colorectal carcinoma patients was higher than the expression observed in healthy tissue (Supplementary Materials Figure S3C). Furthermore, Kaplan–Meier analysis suggests that a high *GPX2* expression in glioblastoma patients results in a low survival rate (*p*-value: 0.0035).

3. Discussion

DAAO has important biotechnological applications such as biosensor, resistance mechanism to herbicides, bioreactor in the synthesis of semisynthetic cephalosporins or α -ketoacids, or in biomedicine, since it has been shown to present cytotoxicity against various tumor cell models [20]. Recently, we demonstrated the cytotoxic effect induced by DAAO with D-Ala in several cell lines from pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma with minimal effects on non-tumor cells [11]. However, free DAAO is unstable. Thus, its immobilization on different support materials and through several strategies has been evaluated in order to increase its stability against pH, hydrogen peroxide or temperature [21–26]. DAAO immobilization in MNPs has been achieved both by covalent methods [27,28] and by affinity interactions through histidine tag [26,29] or the avidin/streptavidin system [30]. In the current study, DAAO protein has been linked to the CLyTA domain (CLyTA-DAAO), which provides a high affinity for choline and derivatives, allowing its immobilization in nanoparticles by affinity methods. This fact has major implications since it has been shown that nanoparticles can cross biological barriers such as the blood–brain barrier, facilitating the access of drugs to brain tumors [31,32].

The main challenge related to the immobilization of enzymes in nanoparticles is to get the protein to bind in a stable way to the immobilization support, retaining most of its biological activity. Among immobilization strategies, non-covalent methods have important advantages: (1) they are gentle procedures; (2) do not require chemical modification of the protein, thus reducing the risk of loss of activity and/or denaturation; (3) in most cases the methods are reversible, which allows the reuse of nanoparticles. Additionally, the use of affinity polypeptides provides the necessary degree of specificity that lack many purely physical adsorption methods by directing the immobilization of the protein through affinity interactions between the tag and the immobilizing support.

In this article, we have compared the immobilization of CLyTA-DAAO enzyme in MNPs, GNPs, and sodium alginate capsules, although only the immobilization on MNPs showed a significantly higher effect than that obtained with the free enzyme (Figure 1A,B).

GNPs are able to bind thiol groups and, this property has been extensively used to functionalize GNPs with amino acids and proteins for medical applications and biological activities [33–35]. GNPs have optical and electrical properties that make them very interesting. In addition, they have low toxicity, are potentially biodegradable, chemically and physically stable, and easy to functionalize [36–39]. The optical and electrical properties of GNPs are dependent on surface plasmon resonance (SPR), which involves the fluctuation and interaction of electrons between positive and negative charges on the surface [38,40]. Due to SPR, when GNPs are irradiated at a certain wavelength, they transform light energy into heat, which can cause hyperthermia or thermal ablation [39]. So far, they have been studied as drug carriers [41], in photodynamic therapy [42] and in diagnostics to detect biomarkers of different types of diseases [43]. We have found that they were less effective than MNPs to retain CLyTA-DAAO activity, probably because the binding through the gold affinity for thiol groups interferes with CLyTA-DAAO conformation modifying its activity, meanwhile than the binding through the CLyTA tag did not. However, it may be that CLyTA-DAAO immobilized in GNPs combined with the possibility to generate hyperthermia inducing SPR might turn this immobilization of CLyTA-DAAO into a useful method for clinical application.

The enzyme has also been immobilized by alginate capsules trapping. Alginate is one of the most widely used polymers in encapsulation due to its high versatility and biocompatibility and because the gel capsules generated protect the immobilized component, increasing its stability and bioavailability [44]. This method has been proven to be less effective retaining CLytA-DAAO activity than MNPs (Figure 1A), maybe because the alginate trap interferes with the interaction between the enzyme and the cells, or because part of the H₂O₂ produced is trapped in the alginate and do not reach the cells.

The structural similarity between DEAE and choline allows us to easily immobilize the chimeric enzyme by the affinity of the CLytA tag for DEAE. This type of immobilization is rapid, specific, and reversible through DEAE's affinity for the CLytA tag. The main advantage of MNPs is the possibility of directing the immobilized drug towards the tumor area through the application of an external magnetic field [45,46]. In addition, they have the advantage that they can be visualized by magnetic resonance imaging [47]. Other interesting feature is that superparamagnetic nanoparticles (<50 nm) produce heat after the application of magnetic fields and therefore can be used for thermal ablation of the tumor [48]. Currently, the FDA has approved Nanotherm[®] as a treatment against glioblastomas, formed by nanoparticles of iron oxide of 15 nm covered with aminosilane [49,50].

Previously, it was demonstrated that DAAO covalently immobilized in MNPs induces cytotoxicity [28]. In our study, a simpler immobilization method has been used, that only involves incubation with nanoparticles. The MNPs used in the previous study showed a certain degree of cytotoxicity per se, which did not occur in our case (Figure 1C,D), opening the possibility to concentrate the nanoparticles on the tumor, avoiding side effects.

These data demonstrate the promising utility of the immobilization of CLytA-DAAO in MNPs. Therefore, our research has focused on the characterization of the greater cytotoxic effect induced by the immobilized enzyme compared to that generated by free CLytA-DAAO. First, dose-response analyses were carried out in several cell models from exocrine pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma, which confirmed that the enzyme immobilized in MNPs was more effective than the free enzyme (Figure 2), presenting lower IC₅₀ values (Table 1). This difference was more evident when treatment time was reduced to 24 h. This effect was especially evident in those cell lines in which the cytotoxic effect of the free enzyme was already very pronounced, as in exocrine pancreatic carcinoma and colorectal carcinoma cell lines (Figure 3, Table 2).

The increased effect produced by the immobilized enzyme in MNPs was due to an increase in the stability of the enzyme, i.e., the enzyme immobilized in MNPs maintains its effect for longer than the free CLytA-DAAO (Figure 6). We discarded the possibility that this could be caused by a higher ROS production (Figure 4) or by a greater speed to produce its effect on tumor cell lines (Figure 5). It is well known that the stability of *R. gracilis* DAAO decreases dramatically above 30 °C [51], and the normal temperature of human cells is 37 °C. Along this line, there are several studies describing the thermal stabilization of DAAO by immobilization on different support materials [26,27,30,52]. In turn, pH in the tumor area is lower than in the rest of the organism. It has also been described that the DAAO stability in pH acid increases when it is immobilized on positively charged supports [27], as occurs with the MNPs used in this work, while decreases when it is immobilized on negatively charged supports [26]. Finally, another advantage of the non-covalent immobilization system is the controlled release of the enzyme from MNPs that can be induced once localized in the tumor by external addition of choline (Figure 7).

To turn the CLytA-DAAO/D-Ala system into a potential anti-cancer treatment, it is important to explore the cell death induction mechanism. In previous studies, it was determined that cell death is dependent on the intracellular ROS increase caused by the reaction catalyzed by CLytA-DAAO [11]. These ROS caused DNA damage and plasma membrane rupture [11], as well as a decrease in the mitochondrial membrane potential during the first hours of treatment with CLytA-DAAO [16]. Besides, here we have demonstrated that this effect is not equivalent to the direct administration of H₂O₂ on tumor cell lines. The dose-response analyses carried out to determine the H₂O₂ concentration equivalent

to the CLytA-DAAO dose to induce the maximum effect on tumor cell lines after 72 h of treatment, already showed differences in the effect (Figure 8A–C, Table 3). Some of the cell lines sensitive to cell death induced by CLytA-DAAO, such as IMIM-PC-2 from pancreatic carcinoma and SW-620 from colorectal carcinoma (Figure 2, Table 1), were more resistant to the simple addition of H₂O₂ (Figure 8A,B, Table 3). In any case, it was determined that 600 µM H₂O₂ induced an anti-proliferative effect similar to that produced by 2 U/mL CLytA-DAAO and 1 mM D-Ala (Figure 8A–C, Table 3).

Consequently, cells were treated with 600 µM H₂O₂ to analyze the cell cycle distribution, the plasma membrane rupture, and the intracellular ROS increase during the first hours of treatment. Regarding the cell cycle analysis, the main effect induced by H₂O₂ in most cell lines was a blockade in G2/M phase, with the exception of HGUE-GB-18 glioblastoma cell line, in which there was an increase in the subG1 phase (Figure 8D), equivalent to the DNA fragmentation observed with the CLytA-DAAO treatment [11]. The anti-proliferative effect of H₂O₂ has been described in lung cancer (Calu-6 and A549) and cervical cancer (HeLa) cell lines with IC₅₀ values of ~50, ~100 and ~75 µM respectively after 24 h of treatment [53,54]. However, both studies showed that only doses below 100 µM produced an increase in the subG1 phase. Moreover, an increase in the percentage of dead cells was observed through trypan blue assays using doses higher than 100 µM [53,54].

The viability assays using 600 µM H₂O₂ revealed the rupture of the plasma membrane mainly in RWP-1 pancreatic carcinoma cell line and SW-480 colorectal carcinoma cell line (Figure 9A), although never reaching the values induced by CLytA-DAAO and D-Ala treatment [11]. Even an increase in the treatment time up to 72 h did not produce the cytotoxicity levels induced by CLytA-DAAO (Figure 9B). In conclusion, the effect induced by H₂O₂ is mainly cytostatic, while CLytA-DAAO and D-Ala cause a cytotoxic effect. Interestingly, the pancreatic carcinoma cell line Hs766T showed a marked cytostatic effect after the H₂O₂ treatment (Figures 8D and 9B) while it is resistant to CLytA-DAAO and D-Ala treatment [11].

The differences observed with H₂O₂ treatment with respect to CLytA-DAAO and D-Ala can be explained by the intracellular ROS increase. Generally, H₂O₂ causes a higher ROS increase than CLytA-DAAO and D-Ala. However, ROS levels also decrease more rapidly (Figures 4 and 9C). Meanwhile, the enzyme produces ROS continuously until the loss of its activity, so the addition of H₂O₂ is not enough to induce a similar cytotoxic effect on tumor cell lines (Supplementary Materials Figure S2 show the H₂O₂ and CLytA-DAAO differential effects). However, more analyses are needed to determine whether there is any other factor influencing the cytotoxic effect induced by CLytA-DAAO.

Another factor to consider in order to determine the potential of CLytA-DAAO as an anti-cancer therapy is the percentage of patients who would be sensitive to this treatment. In cell model studies, two cell lines resistant to cell death induced by CLytA-DAAO were mainly detected: Hs766T from exocrine pancreatic carcinoma and HT-29 from colorectal carcinoma. Subsequently, the resistance mechanisms present in both cell lines were studied [16]. The resistance of Hs766T is related to a high antioxidant response dependent on the high expression of *CAT* and *NFE2L2* genes, but also on a high stress response mediated by p38 and NF-κB [16]. In the case of HT-29, the high basal expression of *GPX2*, an antioxidant gene, influences the resistance but, as in Hs766T, the stress response has an important role [16].

Since the antioxidant response seems to be crucial in the resistance against CLytA-DAAO-induced cell death, in the current work, a pilot study has been initiated to evaluate the *CAT*, *NFE2L2* and *GPX2* expression in biopsies from patients with pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma (Figure 10). The data obtained were complemented with gene expression data extracted from UALCAN database (Supplementary Materials Figure S1).

It is important to highlight that we used the UALCAN database, being aware that our data, obtained in biopsies, are not directly comparable with the data from UALCAN. This is because our data were obtained by q-PCR analysis, and the gene expression was

normalized with the expression of an internal control, meanwhile that the UALCAN data were obtained by differential gene expression analysis and are represented as transcripts of a specific gene per million of transcripts. It is also important to point out that UALCAN database always consider the 25% of the patients with higher values as high expression patients and the 75% remaining patients as medium and lower expression patients. The information that we want to extract from UALCAN is basically whether a specific gene is differentially expressed in comparison with the non-tumor tissue in pancreatic and colorectal carcinoma as well as in glioblastoma and, whether the expression of these genes has been related to patient's survival as an indirect probe that could be involved in antitumoral resistant mechanism.

Taking in consideration only the biopsies of the three types of tumors analyzed, our data found that *CAT* expression, was high in the 43% of pancreatic carcinoma biopsies, in the 40% of colorectal biopsies and in the 60% of glioblastoma samples (Figure 10A). With respect to *NFE2L2*, 10% of patients with pancreatic carcinoma, 60% of patients with colorectal carcinoma and 50% glioblastoma biopsies have high expression levels (Figure 10B). In addition, *GPX2* is overexpressed in 11% and 60% of biopsies with pancreatic and colorectal carcinoma, respectively, while it is not expressed in glioblastoma (Figure 10C). Low or no expression of *GPX2* observed in glioblastoma cell lines and biopsies is in accordance with data collected in UALCAN.

The higher variability in *CAT* and *NFE2L2* expression was observed in glioma biopsies, which also had the highest expression levels (Figure 10A,B). Our analysis using the UALCAN database, however, showed that *CAT* expression was more variable in pancreatic and colorectal carcinoma patients, while the *NFE2L2* expression was very similar between the three types of tumors (Supplementary Materials Figure S3A,B). Certainly, glioblastoma patients showed higher expression of *NFE2L2* with respect to normal tissue (Supplementary Materials Figure S3B). In contrast, while *GPX2* expression between pancreatic and colorectal carcinoma biopsies was very similar in our experiments (Figure 10C), UALCAN data indicate higher variability among pancreatic carcinoma patients (Supplementary Materials Figure S3C). Furthermore, the expression in patients with colorectal carcinoma was significantly higher in comparison with normal tissue (Supplementary Materials Figure S3C).

Finally, when comparing the expression obtained in the biopsies with the observed in the resistant cell lines, the expression of *CAT* and *GPX2* was less than 10% in all the biopsies studied, while there was more variability in the case of *NFE2L2* (Figure 10). Thus, pancreatic and colorectal carcinoma biopsies had an expression level of less than 10% with respect to Hs766T cell line, with the exception of one colorectal carcinoma patient who has 40% lower expression with respect to Hs766T (Figure 10B). And, although there was a lot of variability between glioma biopsies, it should be noted that there were two patients who had an *NFE2L2* expression much higher than that observed in Hs766T cell line (Figure 10B). Altogether, our data suggest that neither *CAT* nor *GPX2* expression would be a problem for the use of CLytA-DAAO in any of the three tumors analyzed. Regarding *NFE2L2*, CLytA-DAAO treatment would not be a problem either in pancreatic or colorectal carcinoma, however, in a percentage of glioblastoma patients, the expression level of these genes suggests a putative resistance to CLytA-DAAO treatment. The importance of ROS in carcinogenesis and treatment resistance in gliomas has been pointed out in the scientific literature [55]. One important relationship between the nuclear factor Nrf2 (*NFE2L2*) and mTOR has been pointed out to explain the complex role of ROS in gliomas. We are taking these data in consideration and increasing our glioblastoma patients' samples and primary cultures in order to probe a cause-effect relationship between CLytA-DAAO activity and *NFE2L2* expression in glioblastoma.

In summary, it is necessary to expand the transcriptomic analysis by increasing the number of biopsies and analyzing the expression of more genes involved in sensitivity or resistance to the treatment with CLytA-DAAO. However, our data suggest that CLytA-DAAO immobilized in MNPs could be used as an anti-cancer therapy against pancreatic

carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma. Moreover, we expect that this treatment would be effective in a high percentage of these patients.

4. Materials and Methods

4.1. Cell Culture

Hs766T, IMIM-PC-2 and RWP-1 pancreatic carcinoma cell lines and HT-29, SW-480 and SW-620 colorectal carcinoma cell lines were provided by the Instituto Municipal de Investigaciones Médicas (IMIM, Barcelona, Spain). HGUE-GB-18, HGUE-GB-37, HGUE-GB-39, and HGUE-GB-42 glioblastoma cell lines were established from primary cultures by our research group in Hospital General Universitario de Elche (HGUE, Elche, Spain) [56]. All cell lines used were maintained as previously described [11].

4.2. Patient Biopsies

Samples and data from patients included in this study were provided by the General University Hospital of Alicante (HGUA) Biobank, integrated in the Spanish National Biobanks Network and in the Valencian Biobanking Network, and were processed following standard operating procedures, with the appropriate approval of the Ethics and Scientific Committees.

4.3. Treatments

Except in dose-response analysis, the CLyTA-DAAO standard concentration used in the different experiments was 2 U/mL with 1 mM D-Ala (Alfa Aesar, Thermo Fisher Scientific, Lancashire, UK) and 600 μ M in H₂O₂ experiments (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). The process to obtain CLyTA-DAAO, its immobilization in magnetic nanoparticles (MNPs), and its subsequent quantification and activity measurement were previously described [11]. The MNPs used were DEAE-FluidMAG magnetic nanoparticles (Chemicell, Berlin, Germany), which have a diameter of 200 nm and are formed by a magnetite core and a DEAE-functionalized starch shell on its surface. Choline chloride (ACROS ORGANICS, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) was used for releasing the enzyme from MNPs.

CLyTA-DAAO immobilization in the gold nanoparticles (GNPs) NITgold COOH-PEG 3000Da (30 nm) (NanoImmunotech, Zaragoza, Spain) was performed taking advantage of the gold affinity for sulfur. The pH of CLyTA-DAAO was increased by dialysis in a sodium phosphate buffer (pH 8). Thus, deprotonating the sulfur from the thiol groups of cysteines. 500 μ g of the dialyzed enzyme were incubated with 4.25×10^{12} of GNPs for 30 min with shaking. The remaining free enzyme was discarded by centrifugation.

For the enzyme trapping in alginate capsules, 100 μ g of CLyTA-DAAO were mixed with 1 mL of a sodium alginate solution. The mixture was then introduced into a syringe and slowly added to a 50 mM calcium chloride solution in stirring. The capsules formed were separated from the solution by filtration and washed with a 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7).

4.4. Cell Death

The percentage of live and dead cells was determined using the Muse[®] Count & Viability Kit (Luminex[®], Austin, TX, USA) following the manufacturer's instructions and results were measured in the Muse[®] Cell Analyzer (Luminex[®], Austin, TX, USA).

4.5. Proliferation Assays

To analyze the anti-proliferative effect generated by the different treatments methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assays were performed. Cells were seeded in 96-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Then, increasing concentrations of treatment were added in sextuplicate and the plate was incubated at the same conditions for 24 or 72 h according to the experiment. After the treatment time, 0.25 mg/mL MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added, and cells were maintained at 37 °C and 5% CO₂ for 3 h. The medium was removed, 200

μL of dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added and the plates were shaken at room temperature for 30 min to dissolve the formazan crystals. Finally, the absorbance at 570 nm was measured on an Eon™ microplate spectrophotometer (BioTeK®, Winooski, VT, USA).

4.6. Cell Cycle Distribution

Cells were seeded in 6-well plates (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. Then, corresponding treatments were added, and cells were maintained in incubation for at least 24 h according to the experiment. Next, cells were trypsinized and fixed in cold ethanol (75%) for at least 1 h at −20 °C. Fixed cells were centrifuged, resuspended in 500 μL of a mixture formed by phosphate buffered saline (PBS) containing 0.5% Triton X-100, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of RNase A (Serva, Heidelberg, Germany), and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of propidium iodide (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated for 30 min at room temperature protected from light. Finally, cell cycle distribution according to the DNA content, was determined using a BD FACSCanto™ flow cytometer (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, NJ, USA).

4.7. Intracellular Free Radicals' Measurement

Cells were seeded in opaque 96-well plates (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. Then, cells were treated with 2 U/mL CLyTA-DAAO and 1 mM D-Ala or 600 μM H₂O₂ for 20–120 min. Along with the treatment, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were added to cells. H2DCF-DA is a probe able to emit fluorescence when is bound to free radicals inside cells. For each treatment time used, a control containing only the probe was added. After the different treatment times, medium was removed, and plates were washed with PBS. Finally, the plate reader POLARstar Omega (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) was used to measure fluorescence using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 520 nm.

4.8. Gene Expression Analysis

Most of the biopsies were obtained from frozen tissue in Optimal Cutting Temperature (OCT) medium since the quality and quantity of the extracted nucleic acids is higher than the obtained from fixed tissue. However, due to lack of material, the study was completed with some paraffin tissue samples.

To isolate RNA from frozen tissue, initially OCT medium was removed, and the tissue was chopped and homogenized in a lysis mix of RLT Plus Buffer with β -ME (1:100). In large samples, to achieve complete degradation of tissue, sonication was performed and RNeasy® Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. To extract RNA from the paraffin-fixed samples, initially paraffin was dissolved in 600 μL mineral oil and samples were incubated for 2 min at 95 °C and centrifuged to remove the oil paraffin mixture, then, the RNeasy® FFPE kit (Qiagen, Hilden, Germany) was used. In both types of sample, the RNA obtained was retrotranscribed into cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). RNeasy® Plus Mini Kit, RNeasy® FFPE kit and High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit were used following the manufacturer's instructions.

Finally, 4 μL of cDNA samples were mixed with 10 μL NZYSpeedy qPCR Probe Master Mix (2 \times), ROX plus (NZYtech, Lisbon, Portugal) and 1 μL predesigned TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and 7300 Real Time PCR System was used to perform quantitative polymerase chain reaction (qPCR). The Taqman Gene Expression Assays used to measure the expression of the following genes were CAT (Hs00156308_m1), NFE2L2 (Hs00975961_g1), GPX2 (Hs01591589_m1) and 18S rRNA (Hs03003631_g1) as endogenous control.

4.9. Statistical Analysis

All data are represented in graphs as the mean \pm standard deviation (SD) of at least three independent data. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), as described in a previous article [11].

5. Conclusions

- Our results demonstrate that CLytA-DAAO bound to MNPs is more effective at inducing cytotoxicity than free CLytA-DAAO in pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma cell models.
- The higher effect is due to the fact that immobilization increases the stability of the enzyme at 37 °C, maintaining its catalytic activity for a longer time.
- The enzyme is bound to the MNPs by a non-covalent immobilization system, which allows the release of the enzyme once it has reached its target by the external addition of choline.
- The cytotoxic effect induced by CLytA-DAAO is due to the prolonged production of ROS over time and is not comparable to adding H₂O₂ directly.
- Expression analysis of genes, which we have previously found to be related to CLytA-DAAO resistance, performed in biopsies as well as data extracted from UALCAN, suggest that CLytA-DAAO bound to MNPs could be effective as an anti-cancer therapy in a wide range of patients from pancreatic carcinoma, colorectal carcinoma, and glioblastoma. However, *NFE2L2* expression has to be taken in consideration, especially in glioblastoma patients.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1477/s1>. Figure S1: Cells accumulation in SubG1 and G2/M phases after a CLytA-DAAO, either free or bound to MNPs, and D-Ala treatment in RWP-1 pancreatic carcinoma cell line and SW-620 colorectal carcinoma cell line, Figure S2: Differential effects between H₂O₂ and CLytA-DAAO treatment in IMIM-PC-2 pancreatic carcinoma cell line, Figure S3: Gene expression analysis in patient samples performed with the UALCAN platform.

Author Contributions: M.S. and J.M.S. participated in conceptualization, funding acquisition, supervision, and project administration. M.F.-B. and E.P.-V. participated in investigation and methodology. M.F.-B., P.G.-M., D.B.-G., C.A., V.M.B. and M.S. participated in validation and formal analysis of data presented in this article. M.F.-B. and M.S. participated in writing the original draft. Finally, P.G.-M., C.d.J.R., D.B.-G., Á.R.-L., C.A., V.M.B., J.M.S. and M.S. participated in reviewing and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Foundation for the Promotion of Health and Biomedical Research of Valencia Region (FISABIO), grant number UGP-19-063, and co-supported by PRECIPITA crowdfunding platform from Spanish Foundation for Science and Technology (FECYT) and donations from Association of women affected by breast cancer in Elche and the region (AMACMEC) to M.S., Miguel Servet Program from Instituto de Salud Carlos III (CP19/00095) to C.d.J.R. and grants from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness, grant numbers BIO2013-47684-R and BIO2016-79323-R, and the RETICS-FEDER RICET, RD16/0027/0010, to J.M.S. The CIBER of Enfermedades Respiratorias (CIBERES) is an initiative of the Spanish Instituto de Salud Carlos III and Spanish National Research Council (CSIC Grant 201820I132).

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of health department of the University General Hospital of Alicante (protocol code PI2019/007, 02/2019).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Acknowledgments: We want to particularly acknowledge the patients and the BioBank HGUA integrated in the Spanish National Biobanks Network and in the Valencian Biobanking Network for its collaboration. Besides, we want to thank IMIM for generously providing us with many of the cell lines used in this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Illanes, A.; Cauherff, A.; Wilson, L.; Castro, G.R. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresour. Technol.* **2012**, *115*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Ali Khan, A.; Alzohairy, M.A. Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review. *Res. J. Biol. Sci.* **2010**, *5*, 565–575. [[CrossRef](#)]
3. Ansari, S.A.; Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 512–523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. De la Rica, R.; Aili, D.; Stevens, M.M. Enzyme-responsive nanoparticles for drug release and diagnostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 967–978. [[CrossRef](#)]
5. Koutsopoulos, S. Molecular fabrications of smart nanobiomaterials and applications in personalized medicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64*, 1459–1476. [[CrossRef](#)]
6. Martinelli, C.; Pucci, C.; Ciofani, G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioeng.* **2019**, *3*, 011502. [[CrossRef](#)]
7. Lu, A.H.; Salabas, E.L.; Schüth, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2007**, *46*, 1222–1244. [[CrossRef](#)]
8. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 489–511. [[CrossRef](#)]
9. Akbarzadeh, A.; Samiei, M.; Davaran, S. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res. Lett.* **2012**, *7*, 144. [[CrossRef](#)]
10. Kim, J.E.; Shin, J.Y.; Cho, M.H. Magnetic nanoparticles: An update of application for drug delivery and possible toxic effects. *Arch. Toxicol.* **2012**, *86*, 685–700. [[CrossRef](#)]
11. Fuentes-Baile, M.; Bello-Gil, D.; Pérez-Valenciano, E.; Sanz, J.M.; García-Morales, P.; Maestro, B.; Ventero, M.P.; Alenda, C.; Barberá, V.M.; Saceda, M. CLyTA-DAAO, free and immobilized in magnetic nanoparticles, induces cell death in human cancer cells. *Biomolecules* **2020**, *10*, 222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Pollegioni, L.; Piubelli, L.; Sacchi, S.; Pilone, M.S.; Molla, G. Physiological functions of D-amino acid oxidases: From yeast to humans. *Cell. Mol. Life Sci.* **2007**, *64*, 1373–1394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Stegman, L.D.; Zheng, H.; Neal, E.R.; Ben-Yoseph, O.; Pollegioni, L.; Pilone, M.S.; Ross, B.D. Induction of cytotoxic oxidative stress by D-alanine in brain tumor cells expressing *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidase: A cancer gene therapy strategy. *Hum. Gene Ther.* **1998**, *9*, 185–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Ben-Yoseph, O.; Ross, B.D. Oxidation therapy: The use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment. *Br. J. Cancer* **1994**, *70*, 1131–1135. [[CrossRef](#)]
15. Yoshikawa, T.; Kokura, S.; Tainaka, K.; Naito, Y.; Kondo, M. A novel cancer therapy based on oxygen radicals. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1617–1620. [[PubMed](#)]
16. Fuentes-baile, M.; García-morales, P.; Pérez-valenciano, E.; Ventero, M.P.; Sanz, J.M.; Romero, C.d.J.; Barberá, V.M.; Alenda, C.; Saceda, M. Cell death mechanisms induced by CLyTA-DAAO chimeric enzyme in human tumor cell lines. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8522. [[CrossRef](#)]
17. López, R.; García, E. Recent trends on the molecular biology of pneumococcal capsules, lytic enzymes, and bacteriophage. *FEMS Microbiol. Rev.* **2004**, *28*, 553–580. [[CrossRef](#)]
18. Sanchez-Puelles, J.M.; Sanz, J.M.; Garcia, J.L.; Garcia, E. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *203*, 153–159. [[CrossRef](#)]
19. Chandrashekar, D.S.; Bachel, B.; Balasubramanya, S.A.H.; Creighton, C.J.; Ponce-Rodriguez, I.; Chakravarthi, B.V.S.K.; Varambally, S. UALCAN: A Portal for Facilitating Tumor Subgroup Gene Expression and Survival Analyses. *Neoplasia* **2017**, *19*, 649–658. [[CrossRef](#)]
20. Pollegioni, L.; Molla, G. New biotech applications from evolved D-amino acid oxidases. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 276–283. [[CrossRef](#)]
21. Golini, P.; Bianchi, D.; Battistel, E.; Cesti, P.; Tassinari, R. Immobilization of d-amino acid oxidase from different yeasts: Characterization and application in the deamination of cephalosporin C. *Enzym. Microb. Technol.* **1995**, *17*, 324–329. [[CrossRef](#)]
22. Fernández-Lafuente, R.; Rodríguez, V.; Mateo, C.; Fernández-Lorente, G.; Arminsen, P.; Sabuquillo, P.; Guisán, J.M. Stabilization of enzymes (D-amino acid oxidase) against hydrogen peroxide via immobilization and post-immobilization techniques. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **1999**, *7*, 173–179. [[CrossRef](#)]
23. Mateo, C.; Abian, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Reversible enzyme immobilization via a very strong and nondistorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *68*, 98–105. [[CrossRef](#)]

24. López-Gallego, F.; Betancor, L.; Mateo, C.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Guisán, J.M.; Fernández-Lafuente, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *J. Biotechnol.* **2005**, *119*, 70–75. [[CrossRef](#)]
25. Zheng, H.; Wang, X.; Chen, J.; Zhu, K.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Yang, S.; Jiang, W. Expression, purification, and immobilization of His-tagged D-amino acid oxidase of *Trigonopsis variabilis* in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *70*, 683–689. [[CrossRef](#)]
26. Kuan, I.; Liao, R.; Hsieh, H.; Chen, K.; Yu, C. Properties of *Rhodotorula gracilis* d-Amino Acid Oxidase Immobilized on Magnetic Beads through His-Tag. *J. Biosci. Bioeng.* **2008**, *105*, 110–115. [[CrossRef](#)]
27. Hsieh, H.C.; Kuan, I.C.; Lee, S.L.; Tien, G.Y.; Wang, Y.J.; Yu, C.Y. Stabilization of d-amino acid oxidase from *Rhodospiridium toruloides* by immobilization onto magnetic nanoparticles. *Biotechnol. Lett.* **2009**, *31*, 557–563. [[CrossRef](#)]
28. Bava, A.; Gornati, R.; Cappellini, F.; Caldinelli, L.; Pollegioni, L.; Bernardini, G. D-amino acid oxidase-nanoparticle system: A potential novel approach for cancer enzymatic therapy. *Nanomedicine* **2013**, *8*, 1797–1806. [[CrossRef](#)]
29. Chien, L.-J.; Lee, C.-K. Biosilicification of dual-fusion enzyme immobilized on magnetic nanoparticle. *Biotechnol. Bioeng.* **2008**, *100*, 223–230. [[CrossRef](#)]
30. Wang, S.J.; Yu, C.Y.; Kuan, I.C. Stabilization of native and double d-amino acid oxidases from *Rhodospiridium toruloides* and *Trigonopsis variabilis* by immobilization on streptavidin-coated magnetic beads. *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1973–1981. [[CrossRef](#)]
31. De Jong, W.H.; Borm, P.J.A. Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. *Int. J. Nanomed.* **2008**, *3*, 133–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lankveld, D.P.K.; Oomen, A.G.; Krystek, P.; Neigh, A.; Troost-de Jong, A.; Noorlander, C.W.; Van Eijkeren, J.C.H.; Geertsma, R.E.; De Jong, W.H. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8350–8361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hosta-Rigau, L.; Olmedo, I.; Arbiol, J.; Cruz, L.J.; Kogan, M.J.; Albericio, F. Multifunctionalized gold nanoparticles with peptides targeted to gastrin-releasing peptide receptor of a tumor cell line. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21*, 1070–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Saxena, V.K.; Deb, R.; Shrivastava, S.; Kantaraja, C.; Kumar, A.; Kumar, S. Functionalizing gold nanoparticles with bluetongue virus multiple peptide antigens utilizing gold-thiol interaction: A novel approach to develop pen side test. *Res. Vet. Sci.* **2012**, *93*, 1531–1536. [[CrossRef](#)]
35. Shukla, R.; Bansal, V.; Chaudhary, M.; Basu, A.; Bhonde, R.R.; Sastry, M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: A microscopic overview. *Langmuir* **2005**, *21*, 10644–10654. [[CrossRef](#)]
36. Sun, T.; Zhang, Y.S.; Pang, B.; Hyun, D.C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12320–12364. [[CrossRef](#)]
37. Connor, E.E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C.J.; Wyatt, M.D. Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small* **2005**, *1*, 325–327. [[CrossRef](#)]
38. Abadeer, N.S.; Murphy, C.J. Recent Progress in Cancer Thermal Therapy Using Gold Nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **2016**, *120*, 4691–4716. [[CrossRef](#)]
39. Hu, X.; Zhang, Y.; Ding, T.; Liu, J.; Zhao, H. Multifunctional Gold Nanoparticles: A Novel Nanomaterial for Various Medical Applications and Biological Activities. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 990. [[CrossRef](#)]
40. Ramalingam, V. Multifunctionality of gold nanoparticles: Plausible and convincing properties. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2019**, *271*, 101989. [[CrossRef](#)]
41. Brown, S.D.; Nativo, P.; Smith, J.A.; Stirling, D.; Edwards, P.R.; Venugopal, B.; Flint, D.J.; Plumb, J.A.; Graham, D.; Wheate, N.J. Gold nanoparticles for the improved anticancer drug delivery of the active component of oxaliplatin. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4678–4684. [[CrossRef](#)]
42. Stuchinskaya, T.; Moreno, M.; Cook, M.J.; Edwards, D.R.; Russell, D.A. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using antibody-phthalocyanine-gold nanoparticle conjugates. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2011**, *10*, 822–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Cordeiro, M.; Carlos, F.F.; Pedrosa, P.; Lopez, A.; Baptista, P.V. Gold nanoparticles for diagnostics: Advances towards points of care. *Diagnostics* **2016**, *6*, 43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Pereda, M.; Poncelet, D.; Renard, D. Characterization of Core-Shell Alginate Capsules. *Food Biophys.* **2019**, *14*, 467–478. [[CrossRef](#)]
45. Dobson, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery. *Drug Dev. Res.* **2006**, *67*, 55–60. [[CrossRef](#)]
46. Arruebo, M.; Fernández-Pacheco, R.; Ibarra, M.R.; Santamaria, J. Magnetic Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Nanotoday* **2007**, *2*, 22–32. [[CrossRef](#)]
47. Yoo, D.; Lee, J.H.; Shin, T.H.; Cheon, J. Theranostic magnetic nanoparticles. *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 863–874. [[CrossRef](#)]
48. Dennis, C.L.; Ivkov, R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.* **2013**, *29*, 715–729. [[CrossRef](#)]
49. Sanchez, C.; Belleville, P.; Popall, M.; Nicole, L. Applications of advanced hybrid organic–inorganic nanomaterials: From laboratory to market. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 696–753. [[CrossRef](#)]
50. Thiesen, B.; Jordan, A. Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.* **2008**, *24*, 467–474. [[CrossRef](#)]
51. Pollegioni, L.; Caldinelli, L.; Molla, G.; Sacchi, S.; Pilone, M.S. Catalytic properties of D-amino acid oxidase in cephalosporin C bioconversion: A comparison between proteins from different sources. *Biotechnol. Prog.* **2004**, *20*, 467–473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Betancor, L.; Hidalgo, A.; Fernandez-Lorente, G.; Mateo, C.; Rodriguez, V.; Fuentes, M.; Lopez-Gallego, F.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisan, J.M. Use of Physicochemical Tools to Determine the Choice of Optimal Enzyme: Stabilization of D-Amino Acid Oxidase. *Biotechnol. Prog.* **2003**, *19*, 784–788. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Park, W.H. Hydrogen peroxide inhibits the growth of lung cancer cells via the induction of cell death and G1-phase arrest. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 1787–1794. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Park, W.H. Anti-apoptotic effect of caspase inhibitors on H₂O₂-treated HeLa cells through early suppression of its oxidative stress. *Oncol. Rep.* **2014**, *31*, 2413–2421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Rinaldi, M.; Caffo, M.; Minutoli, L.; Marini, H.; Abbritti, R.V.; Squadrito, F.; Trichilo, V.; Valenti, A.; Barresi, V.; Altavilla, D.; et al. ROS and brain gliomas: An overview of potential and innovative therapeutic strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 984. [[CrossRef](#)]
56. Ventero, M.P.; Fuentes-Baile, M.; Quereda, C.; Perez-Valeciano, E.; Alenda, C.; Garcia-Morales, P.; Esposito, D.; Dorado, P.; Manuel Barbera, V.; Saceda, M. Radiotherapy resistance acquisition in Glioblastoma. Role of SOCS1 and SOCS3. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212581. [[CrossRef](#)]

