

RODRIGUEZ, MATIAS EXEQUIEL

Resolución a la tarjeta telefónica en el estado de alicante libro 10001

75117

2016 75117



-2016-

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

TESIS DOCTORAL

**Resistencia a la terapia fotodinámica en
un modelo de microambiente tumoral:**

Implicancias de la autofagia activada por HIF-1.

Lic. Matías Exequiel Rodríguez

TRICV

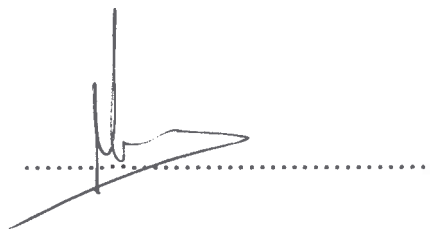
75117

MF.
Clasif.
T-1035

Tesis Doctoral para optar por el título de **Doctor en Ciencias Biológicas**, bajo la dirección de la Dra. Viviana A. Rivarola y Co-dirección de la Dra. María I. Colombo. Realizada en la Universidad Nacional de Río Cuarto, Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales, Departamento de Biología Molecular.

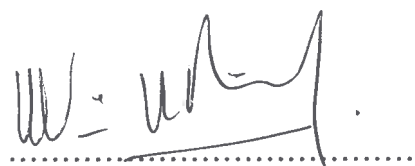
Doctorando:

Lic. Matías Exequiel Rodríguez



Directora:

Dra. Viviana A. Rivarola



Co-directora:

Dra. María I. Colombo

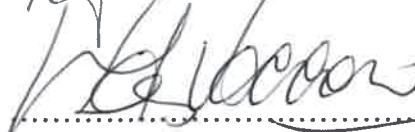


Miembros del jurado:

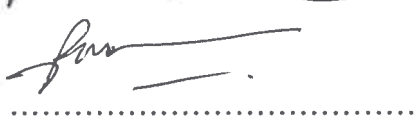
Dra. Mariel A. Fanelli



Dra. María I. Vaccaro



Dr. Pablo Bosch



Río Cuarto, 29 de abril de 2016

AGRADECIMIENTOS

A mi Familia. Gracias por estar en cada momento, a mis **PADRES**, GRACIAS por el apoyo incondicional. Este logro se lo debo a ustedes.

A mi grupo de trabajo, por el apoyo de todos en estos 8 años compartidos. Especialmente GRACIAS VIVI!! por los logros obtenidos juntos, por el apoyo en todo momento, por las charlas de colegas y sobre todo por las charlas de amigos. Fuiste una jefa excepcional y sos una gran amiga.

A Dani (y Oli) y Yani, por el apoyo y la colaboración en este proyecto, el mayor de los éxitos para ambas. Al lab 4!! Lauri y Sol gracias por todo lo compartido, y por la ayuda en este proyecto, papers, reviews... y todo lo que venga, GRACIAS. Renzo, amigo, por todo lo compartido estos últimos años, la mejor de las suertes para vos. Y al resto del equipo, Luis, Juli, Belen y los nuevos integrantes, Male, Belu, Nanu, Pame (Tamy), Lu, Laura, EXITOS y gracias por tantos años de buena onda.

A Tamy (la verdadera Tamy), GRACIAS por todo lo compartido, gran GRAN compañera de sala de cultivos... y mates... y cervezas... y vinos.... Y sigue... EXITOS!!!

Al mi Co-directora, Dra. María I Colombo y su grupo de trabajo por el apoyo y la formación que me brindaron durante mi estadía en su laboratorio.

Al grupo de trabajo de la Dra. María I Vaccaro, por todo el apoyo y la buena onda recibida durante mi estadía.

A los miembros del jurado, gracias por el apoyo y recomendaciones en estos 5 años de trabajo.

A La universidad Nacional de Rio Cuarto, por la posibilidad de realizar mi doctorado.

RESUMEN

El estudio de las interacciones celulares en el microambiente tumoral se ha convertido en una de las principales áreas de investigación en la lucha contra el cáncer. La hipoxia y la autofagia han sido reconocidas como fenómenos activos en el microambiente tridimensional de los tumores sólidos debido a la pobre difusión de oxígeno y nutrientes en regiones alejadas de los capilares sanguíneos. La respuesta celular a la hipoxia está mediada principalmente por el factor de transcripción HIF-1 el cual modula la activación de la angiogénesis y vías de supervivencia que permiten la adaptación de la célula tumoral a este microambiente hostil. Además, resulta interesante que, en los últimos años, se ha demostrado que dicho factor puede inducir la activación de la vía autofágica, un mecanismo que promueve la supervivencia celular bajo diferentes condiciones de estrés. Sin embargo, los mecanismos moleculares subyacentes, a través de los cuales HIF-1 induce autofagia, necesitan ser estudiados con detalle.

Tanto HIF-1 como la autofagia han sido vinculadas a la resistencia a tratamientos antitumorales incluyendo la Terapia Fotodinámica (TFD). La TFD consiste en la aplicación de fotosensibilizadores que al ser irradiados producen Especies Reactivas del Oxígeno, las cuales provocan a la muerte del tumor. Sin embargo, no hay reportes que demuestren la implicancia de la autofagia mediada por HIF-1 sobre la respuesta tumoral a la TFD.

En este trabajo, se emplearon tres modelos de estudio (cultivos en monocapa, cultivos tridimensionales y tumores in vivo) y evaluó cómo HIF-1 y la autofagia trabajan juntos para modular la respuesta celular a la TFD, además, se estudió el mecanismo molecular a través del cual HIF-1 controla autofagia para mediar la resistencia de células tumorales de cáncer de colon al tratamiento fotodinámico.

Se demostró que la activación de HIF-1, induce autofagia a través de un nuevo mecanismo que involucra la regulación transcripcional de la proteína autofágica VMP1. HIF-1 aumentó el flujo autofágico determinado por un aumento de la relación LC3-II/LC3-I, disminución de p62, aumento de VMP1 y agregación de RFP-LC3. Asimismo, la autofagia inducida por HIF-1 promueve resistencia a la TFD. Por otro lado, se

demonstró que el tratamiento fotodinámico, *per se*, puede inducir autofagia a través de la activación de la vía HIF-1/VMP1.

Empleando cultivos 3D que recapitulan la arquitectura tridimensional de los tumores sólidos así como algunas de las características biológicas observadas en pacientes con cáncer, tales como la hipoxia, se estudió la naturaleza molecular de la resistencia a la TFD en un contexto de microambiente tumoral y revelamos, por primera vez, que la resistencia intrínseca a la TFD, observada en los cultivos 3D, puede ser explicada en términos de una “autofagia protectora” controlada por HIF-1.

Por último, se evaluó el efecto de la inhibición farmacológica de la autofagia con Cloroquina (CQ) sobre el crecimiento tumoral. Se generaron tumores en ratones inmunodeprimidos y los animales se trataron con TFD, CQ o TFD+CQ. Los tumores fueron resistentes a la TFD. Sin embargo, hubo una disminución del 40% del crecimiento tumoral cuando la autofagia fue inhibida con CQ y la combinación TFD+CQ redujo dramáticamente el crecimiento de los tumores en un 75% respecto al tratamiento con TFD.

En conclusión, esta tesis reporta por primera vez que: 1- HIF-1 controla autofagia a través de la regulación de la expresión de VMP1; 2- La TFD induce autofagia, a través de la vía HIF-1/VMP1, como mecanismo de resistencia; 3- Los cultivos tridimensionales son resistentes a la TFD debido, al menos en parte, a la actividad autofágica intrínseca dependiente de HIF-1; 4- La combinación de TFD con el inhibidor farmacológico *Cloroquina*, sensibiliza los tumores resistentes al efecto fototóxico.

ABSTRACT

The analysis of cellular interactions in the tumor microenvironment has generated great interest in the cancer research. It has been shown that hypoxia and autophagy may be induced in the three-dimensional environment of solid tumors due to cancer cells can quickly outgrow the existing vasculature and have decreased access to nutrients and oxygen. The Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) is the major regulator for resistance to cell death and proliferation of cancer cells by providing a growth advantage under hypoxic stress. Recently, it has been shown that in response to hypoxia, cells can induce HIF-1-mediated autophagy to survive in this hostile microenvironment. However, the molecular mechanisms by which HIF-1 induces autophagy need to be explored in detail.

HIF-1 and autophagy can promote resistance to anticancer treatments including PDT. PDT consist in the use of a light-sensitizing agent, or photosensitizer (PS), followed by illumination of the tumor with visible light; this leads to the production of reactive oxygen species (ROS) that cause direct damage to the tumor. However, the interplay between HIF-1 and autophagy in PDT context has not studied yet.

Here, we employed three type of cultures models (monolayer cultures, three-dimensional cultures and xenograft model) and examine how hypoxia and autophagy work together to modulate cancer cell response to PDT and the molecular pathways by which HIF-1 induces autophagy to mediate photodynamic therapy resistance in colon cancer cells.

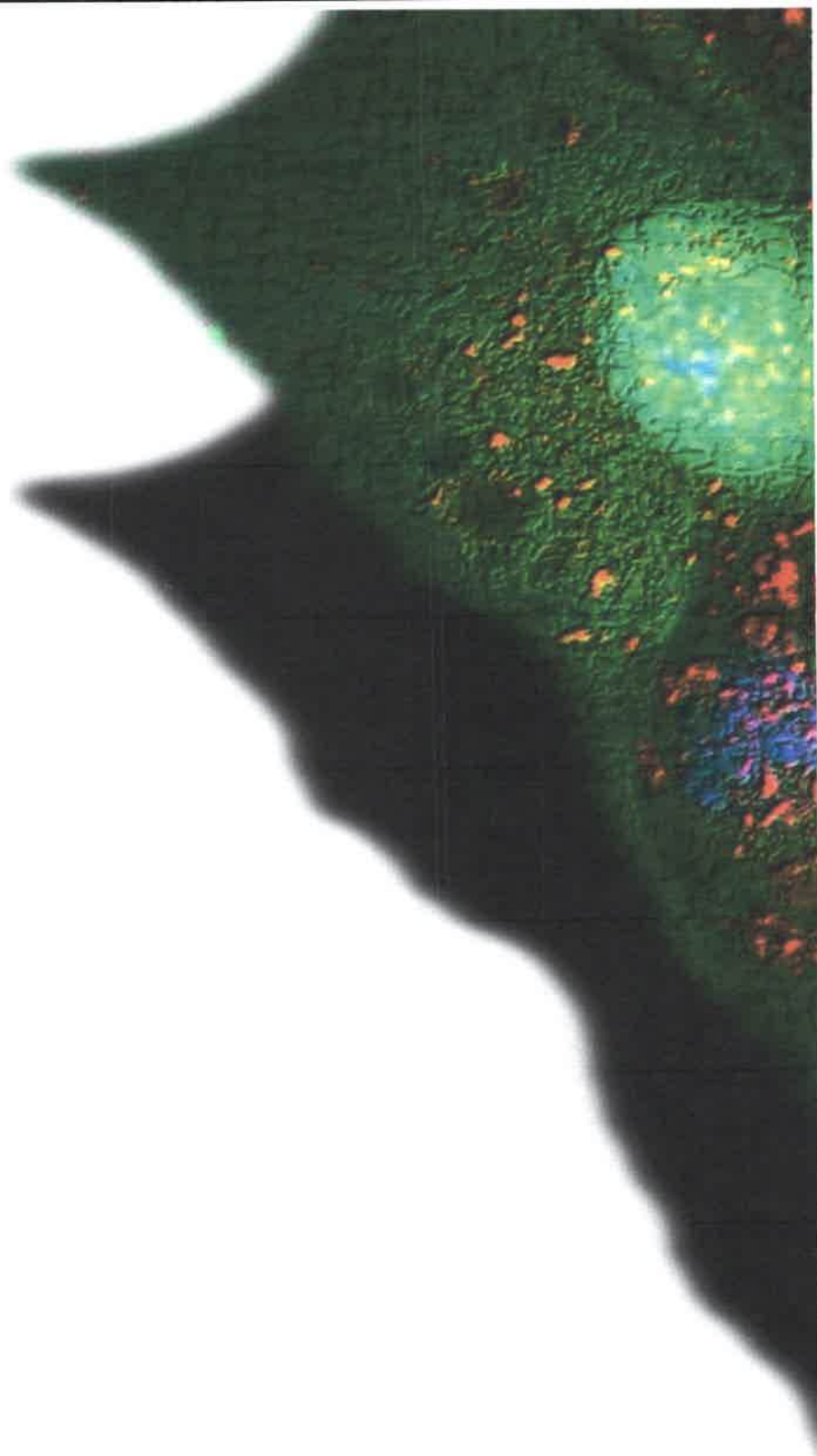
We found that HIF-1 promotes autophagy by increasing expression of VMP1, LC3II processing, RFP-LC3 aggregation and decreasing level of p62. Moreover, HIF-1-induced autophagy promotes resistance to PDT. On the other hand, PDT induces autophagy as a survival mechanism in colon cancer cells by induction of the novel HIF-1 α /VMP1 pathway.

Employing three-dimensional cultures of colon cancer cells that recapitulate the architecture of solid tumors and same of the biological features observed in cancer patients, such as hypoxia which was widely related to tumor resistance to chemo-radiotherapy, we addressed the molecular nature of PDT resistance in a tumor microenvironment context and revealed for the first time that intrinsic resistance to

photodynamic therapy in 3D spheroid, can be molecularly explained in terms of protective autophagy triggered by HIF-1 factor.

Finally, the effect of systemic inhibition of autophagy flux by chloroquine (CQ) treatment on tumor growth were evaluated in vivo using a xenograft animal model. These animals were treated with PDT, CQ, combination PDT+CQ or non-treated (NT) and tumor growth was analyzed. PDT treatment failed to prevent tumor growth in animals xenografted with colon cancer cells. However, the tumor growth rate after inhibition of autophagic flux by systemic CQ treatment was significantly smaller (40%). Remarkably, co-treatment of the chloroquine-treated xenograft with PDT shows a dramatic reduction of tumor growth (75%).

Conclusions: This work reveals for the first time: 1- HIF-1 modulates autophagy by a novel HIF-1/VMP1 pathway; 2- PDT induce HIF-1/VMP1/Autophagy as resistance mechanism; 3- The intrinsic HIF-1-dependent autophagic activity of 3D spheroids confers resistance to PDT; 4- The combination of PDT + Chloroquine sensitizes tumor of colon cancer cells to PDT effect.



ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ABREVIACIONES.....	1
---------------------------	----------

INTRODUCCIÓN**CAPÍTULO 1**

1. CÁNCER.....	5
1.1. Características de las células cancerosas.....	6
1.2. Desarrollo del cáncer.....	6
1.2.1. Formación del tumor primario.....	6
1.2.2. Invasión y metástasis.....	7
1.2.2.1. Escape celular o invasividad.....	8
1.2.2.2. Angiogénesis.....	9
1.2.2.3. Formación del tumor secundario: metástasis.....	10
1.3. Bases moleculares: genes responsables del cáncer.....	11
1.3.1. Oncogenes y genes oncosupresores.....	11
1.4. Cáncer de colon.....	12
1.4.1. Clasificación del cáncer de colon.....	12
1.4.2. Tratamientos.....	13
1.4.2.1. Estadio 0.....	13
1.4.2.2. Estadio I.....	13
1.4.2.3. Estadio III.....	14
1.4.2.4. Estadio IV.....	14

CAPÍTULO 2

2. TERAPIAS ANTICANCERÉGENAS.....	15
2.1. Cirugía.....	15
2.2. Quimioterapia.....	16
2.3. Radioterapia.....	17
2.4. Terapia hormonal.....	17
2.5. Inmunoterapia.....	18
2.5.1. Inmunoterapia basada en células dendríticas.....	18
2.5.2. Inmunoterapia basada en células T.....	18

2.6. Terapia fotodinámica.....	19
2.6.1. Mecanismo de la TFD.....	21
2.6.2. Inducción de apoptosis por TFD.....	23
2.6.3. Inducción de necrosis por TFD.....	25
2.6.4. Inducción de autofagia por TFD.....	26
2.7. Fotosensibilizadores.....	27
2.7.1. Ácido delta 5-aminolevulínico.....	28
2.7.2. Metil-ácido delta 5-aminolevulínico.....	29
2.8. Aplicación de la TFD en cáncer de colon.....	30
 CAPÍTULO 3	
3. AUTOFAGIA.....	32
3.1. Autofagia, muerte celular y cáncer.....	33
3.2. Regulación del proceso autofágico.....	35
3.2.1. Iniciación: el complejo mTOR/ULK y PI3KIII.....	36
3.2.2. Nucleación.....	38
3.2.3. Expansión: sistemas de conjugación de proteínas tipo ubiquitina...38	
3.2.4. Formación del autolisosoma.....	40
3.3. Regulación del proceso autofágico: El Factor Inducible por Hipoxia.....	41
 CAPÍTULO 4	
4. RESISTENCIA A LA TFD: implicancias del microambiente tumoral.....	43
4.1. La TFD induce la expresión de HIF-1 y activación de autofagia.....	46
HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	50
 CAPÍTULO 5	
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
5.1. MATERIALES.....	52
5.1.1. Medio de crecimiento para cultivos celulares.....	52
5.1.2. Medios y reactivos para cultivo bacteriano.....	52
5.1.3. MTT.....	52
5.1.4. Anticuerpos.....	52

5.1.5. Compuesto fotosensibilizador.....	53
5.1.6. Plásmidos.....	53
5.1.7. Reactivos de transfección.....	53
5.1.8. Inductores inhibidores de autofagia.....	53
5.1.9. Monodancilcadaverina.....	53
5.1.10. Irradiador.....	53
5.2. MÉTODOS.....	54
5.2.1. Bacterias competentes.....	54
5.2.2. Transformación.....	54
5.2.3. Miniprep.....	54
5.2.4. Cultivos celulares.....	55
5.2.5. Generación de esferoides.....	55
5.2.6. Expresión de HIF-1 α y marcadores de flujo autofágico luego del tratamiento con CoCl ₂ o terapia fotodinámica mediante western blot.....	55
5.2.7. Ensayo de actividad transcripcional de HRE-EGFP.....	56
5.2.8. Inmunofluorescencia indirecta.....	56
5.2.9. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina.....	57
5.2.10. Determinación de la viabilidad celular.....	58
5.2.11. Terapia Fotodinámica.....	58
5.2.12. Evaluación de la resistencia a la terapia fotodinámica empleando activadores e inhibidores de autofagia.....	59
5.2.13. Silenciamiento de HIF-1 α /VMP1: evaluación de actividad autofágica y respuesta a la TFD.....	60
5.2.14. Generación de la línea estable CaCo2G.....	61
5.2.15. Determinación de la formación de PpIX en esferoides.....	62
5.2.16. Tinción con monodancilcadaverina.....	62
5.2.17. Generación de partículas virales/generación de líneas estables reporteras de HIF/autofagia.....	62
5.2.18. Transducción de células diana.....	63

5.2.19. Determinación de la generación de sitios hipóxico en esferoides tumorales y distribución de RFD-LC3.....	64
5.2.20. Ensayo de crecimiento tumoral.....	65
5.2.21. ImageJ.....	66
5.2.22. Análisis estadísticos.....	66

CAPÍTULO 6

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
6.1. El Factor Inducible por Hipoxia induce autofagia a través de VMP1.....	67
6.1.1. HIF-1 α induce autofagia en células de cáncer de colon.....	68
6.1.2. La proteína autofágica VMP1: un nuevo target de HIF-1.....	72
6.2. HIF-1 confiere resistencia a la TFD a través de la inducción de autofagia en células de cáncer de colon.....	75
6.3. La Terapia Fotodinámica empleando ALA-Met induce autofagia dependiente de HIF-1.....	78
6.3.1. La TFD/ALA-Met induce autofagia en células de cáncer de colon..	80
6.3.2. La autofagia confiere resistencia a la TFD/ALA-Met en células de cáncer de colon.....	80
6.3.3. La TFD induce autofagia dependiente de HIF-1 α y VMP1.....	84
6.4. El microambiente tumoral: un nuevo paradigma.....	89
6.4.1. Generación de cultivos tridimensionales.....	90
6.4.2. Los cultivos tridimensionales inducen actividad de HIF-1.....	92
6.4.3. Los cultivos tridimensionales inducen flujo autofágico en sitios con actividad transcripcional de HIF-1.....	95
6.4.4. Los cultivos tridimensionales inducen autofagia dependiente de HIF1.104	
6.5. Los esferoides tumorales son resistentes a la TFD.....	110
6.5.1. Incorporación de ALA-Met en esferoides tumorales.....	111
6.5.2. TFD/4 mM ALA-Met.....	115
6.6. HIF-1/autofagia protege a los esferoides tumorales del efecto fototerapéutico.....	116

6.7. HIF-1 controla autofagia en xenografias de ratones inmunodeprimidos.....	121
6.8. Tratamiento combinado <i>in vivo</i> : TFD + inhibidor de autofagia.....	125
CONCLUSIONES FINALES.....	131
BIBLIOGRAFÍA.....	133
ÍNDICE DE FIGURAS	
Figura 1.1. Inicio del tumor desde una célula con un cambio genético.....	7
Figura 1.2. Desprendimiento e invasión de células tumorales.....	8
Figura 1.3. Liberación de factores angiogénicos.....	9
Figura 1.4. Desprendimiento y migración de células tumorales a través de vasos sanguíneos y linfáticos.....	10
Figura 2.1. Esquema de aplicación de terapia fotodinámica.....	11
Figura 2.2. Vía de síntesis del grupo Hemo dentro de las células.....	28
Figura 3.1. Modelo esquemático de la macroautofagia.....	32
Figura 3.2. Representación esquemática mostrando el rol de la interacción VMP1-Beclinal1 durante el proceso autofágico.....	37
Figura 3.3. Dos sistemas de conjugación tipo ubiquitina durante la expansión del autofagosoma.....	39
Figura 3.4. HIF-1 induce autofagia a través de la expresión de BNIP3.....	42
Figura 4.1. Representación esquemática del empleo de cultivos tridimensionales.....	48
Figura 4.2. Modelo que explica el rol de la autofagia como mecanismo de resistencia a la TFD según (Milla et al. 2003).....	49
Figura 6.1.1.1. El CoCl ₂ induce expresión y actividad transcripcional de HIF-1 en células de cáncer de colon.....	68
Figura 6.1.1.2. El CoCl ₂ induce autofagia en células de cáncer de colon.....	69
Figura 6.1.1.3. HIF-1 α regula la autofagia inducida por el CoCl ₂	70
Figura 6.1.2. HIF-1 regula la expresión de VMP1.....	72
Figura 6.2.1. HIF-1 α confiere resistencia a la TFD.....	75
Figura 6.2.2. HIF-1 induce resistencia a TFD a través de la autofagia.....	76
Figura 6.3.1. La TFD induce activación del flujo autofágico.....	78
Figura 6.3.2.1. Diseño experimental.....	82

Figura 6.3.2.2. El bloqueo de la autofagia sensibiliza a las células de cáncer de colon a la TFD.....	84
Figura 6.3.3.2. La TFD induce autofagia a través de VMP1.....	85
Figura 6.3.3.3. VMP1 confiere resistencia a la TFD.....	86
Figura 6.3.4. Modelo integrador HIF-1/autofagia/TFD.....	88
Figura 6.4.1. Las células CaCo2 y SW480 generan esferoides tumorales.....	91
Figura 6.4.2.1. Generación de la línea SW480-HRE-RL.....	93
Figura 6.4.2.2. Los esferoides tumorales inducen activación de HIF-1.....	94
Figura 6.4.3.1. Los esferoides inducen activación de autofagia en la región central....	95
Figura 6.4.3.2. Los esferoides inducen activación de autofagia en áreas con actividad transcripcional de HIF-1.....	97
Figura 6.4.3.3. Los esferoides de CaCo2 inducen autofagia.....	98
Figura 6.4.3.4. Los esferoides de células de cáncer de colon inducen flujo autofágico.....	103
Figura 6.4.3.5. Los esferoides inducen autofagia dependiente del tiempo de formación.....	104
Figura 6.4.4.1. Bloqueo de HIF-1 α	105
Figura 6.4.4.2 Los esferoides inducen autofagia dependiente de HIF-1.....	106
Figura 6.4.4.3. La inhibición de HIF-1 α bloquea la formación de vesículas autofágicas.....	107
Figura 6.5.1 Los esferoides tumorales son resistentes a la TFD.....	110
Figura 6.5.1.1. Los esferoides de 10.000 células no incorporan ALA-Met.....	112
Figura 6.5.1.2. El aumento de concentración de ALA-Met induce formación de PpIX en esferoides de 10.000 células.....	114
Figura 6.5.1.3. Respuesta a la TFD/4mM de ALA-Met de esferoides de CaCo2 y SW480.....	115
Figura 6.6.1. La vía HIF-1/autofagia activa en los esferoides tumorales confiere resistencia a la TFD.....	117
Figura 6.6.2. La región central de los esferoides sobrevive luego de la TFD.....	118
Figura 6.7.1. HIF-1 controla autofagia en xenografías de tumores de cáncer de colon.....	123
Figura 6.7.2. El bloqueo de HIF-1 α inhibe el crecimiento tumoral.....	124
Figura 6.8.1. La combinación de TFD von cloroquina sensibiliza a los tumores al tratamiento fotodinámico.....	128

Figura 6.8.2. Resumen de resultados.....130

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen las líneas estables generadas a partir de la transducción con partículas lentivirales.....64

Tabla 2. Resumen de los activadores e inhibidores utilizados, Nombre, función y concentración de trabajo.....81

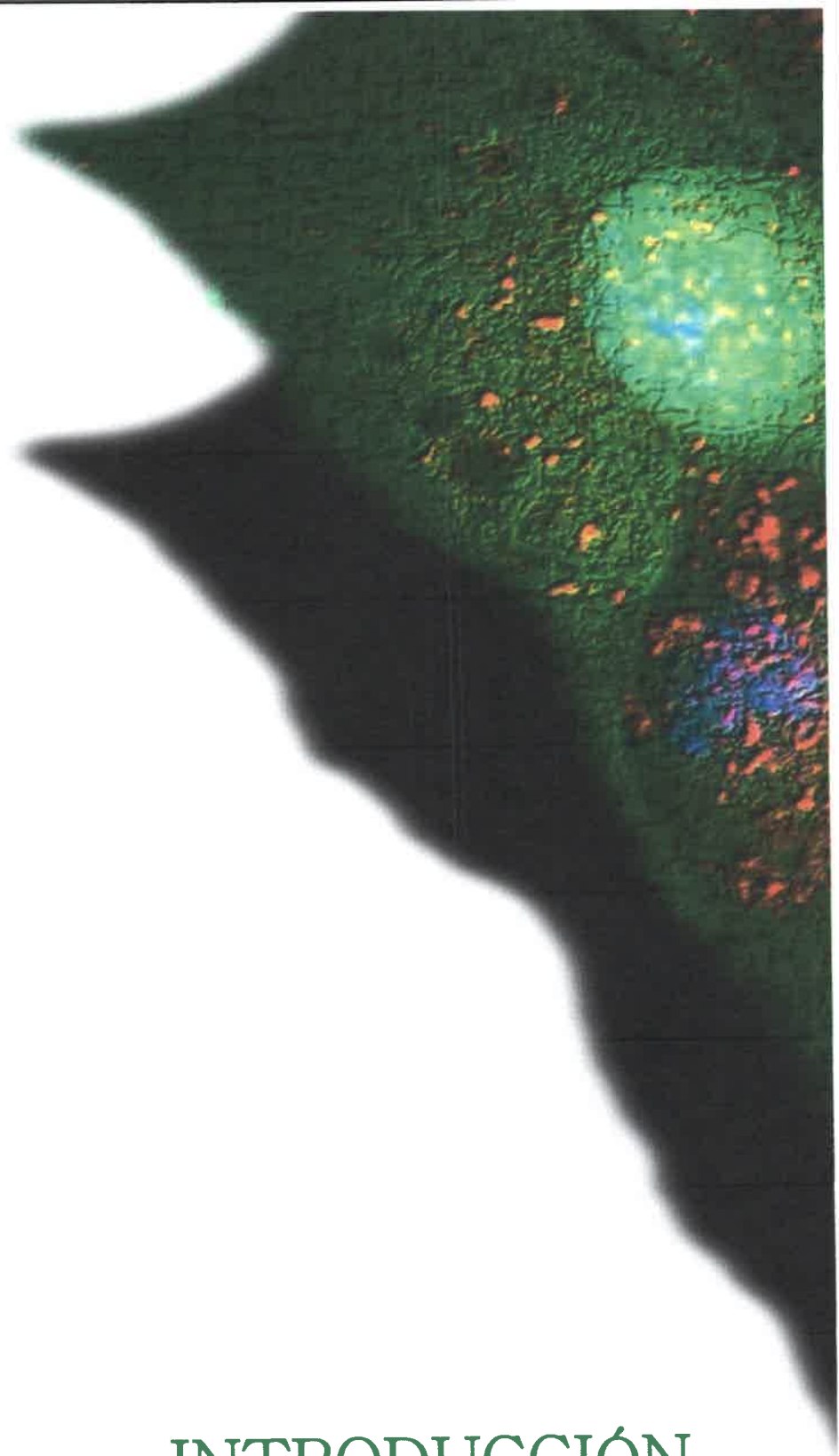
ABREVIATURAS

- **3-Ma:** 3-Metiladenina.
- **5-FU:** 5-Fluorouracilo.
- **ABC:** Transportadores con Casete de unión a ATP.
- **ADN:** Ácido Ribonucleico.
- **AIF:** Factor Inductor de Apoptosis.
- **AKT/PKB:** Proteína Quinasa B.
- **ALA:** Ácido delta 5-aminolevulínico.
- **ALA-Met:** Metil Ácido delta 5-aminolevulínico.
- **AMBRA:** Molécula Activadora en Autofagia Regulada por Beclina 1.
- **AMPK:** Proteína Quinasa Activada por AMP.
- **APAF-1:** Factor Activador de Proteasa Apoptótica 1.
- **ARN:** Ácido Desoxirribonucleico.
- **ATGs:** Genes Relacionados a la Autofagia.
- **ATP:** Adenosín trifosfato.
- **Bad:** Agonista de Muerte Celular Asociada a Bcl2.
- **Bak:** (*BCL2-antagonist/killer 1*)
- **Bap-31:** Proteína 31 Asociada a Receptores de Células B.
- **Bax** Proteína X asociada a Bcl-2.
- **Bcl-2:** (*B-cell lymphoma 2*).
- **BECN1:** Beclina 1.
- **BFGF:** Factor básico de crecimiento de fibroblastos.
- **Bid:** (*BH3 interacting domain death agonist*)
- **BIF:** Factor de Interacción con Bax.
- **BNIP3:** Proteína 3 de 19 kDa de interacción con Bcl-2/Proteína de adenovirus E1B.
- **CCR:** Carcinoma colorrectal.
- **ChIP:** Inmunoprecipitación de la Cromatina.
- **CMTs:** Células Madres tumorales
- **CQ:** Cloroquina.

- **DEIS:** Dirección de Estadísticas e Información de Salud.
- **DFCP1:** Proteína 1 conteniendo doble FYVE.
- **DISC:** Complejo de Señalización Inductor de Muerte.
- **DNA-PKcs:** Subunidad Catalítica de Proteína Quinasa Asociada a ADN.
- **DR:** Receptor de Muerte.
- **EGFP:** Proteína Verde Fluorescente (Potenciada).
- **Endo G:** Endonucleasa G.
- **EROs:** Especies Reactivas del Oxígeno.
- **ESCRT:** Complejo Endosomal de Clasificación Requerido para el Transporte.
- **FADD:** Dominio de Muerte Asociado a Fas.
- **FAK:** Quinasa de Adhesión Focal.
- **Fas L:** Ligando Fas.
- **FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos.
- **FIP200:** Proteína de Interacción con FAK de 200 kDa.
- **FOS:** Oncogén de Osteosarcoma Murino FBJ.
- **FOX:** “(Forkhead box) proteins”.
- **FS:** Fotosensibilizador.
- **GABARAP:** Proteína Asociada a Receptor GABA(A).
- **GATE16:** ATPasa Potenciadora Asociada a Golgi de 16 kDa.
- **HIF-1 α :** Factor Inducible por Hipoxia alpha.
- **HRE:** Elementos de Respuesta a Hipoxia.
- **HSP:** Proteínas de Shock térmico.
- **IAP:** Proteína Inhibidora de Apoptosis.
- **IARC:** Agencia Internacional de Investigación del Cáncer.
- **ICAD:** Inhibidor de la Desoxiribonucleasa Activada por Caspasas.
- **IFI:** Inmunofluorescencia Indirecta.
- **IL-2:** Interleucina-2.
- **INC:** Instituto Nacional de Cáncer.
- **IP:** Intraperitoneal.
- **J/Cm²:** Juole por centímetro cuadrado.
- **JNK:** (*c-Jun N-terminal kinase*).

- **LAMP:** Proteína asociada a la membrana lisosomal.
- **LC3:** Cadena liviana 3 de Proteína Asociada a Microtúbulo 1A/1B.
- **LD50:** Dosis letal 50%.
- **LIT:** Linfocitos Infiltrantes del Tumor.
- **MAPK:** Proteína Quinasa Activada por Mitógenos.
- **MDC:** Monodansilcadaverina.
- **MEA:** Agencia de Medicina Europea.
- **MEC:** Matriz Extracelular.
- **MHLW:** Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar.
- **miRNA-210:** Micro ARN-210.
- **mTOR:** Proteína "*Target*" de Rapamicina en Células de Mamíferos.
- **mTORC1:** Complejo mTOR 1.
- **MTT:** Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
- **MYC:** Oncogén de Mielocitomatosis aviar.
- **NF- κ B:** Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras Kappa de las células B.
- **NIX:** "NIP3-like protein X".
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **PARP:** Poli ADP Ribosa Polimerasa.
- **PE:** Fosfatidiletanolamina.
- **PHD:** Prolil-hidroxilasas.
- **PI3K:** Fosfoinositol 3-quinasa.
- **PIK3R4:** Subunidad Regulatoria 4/Fosfoinositol 3-quinasa.
- **PIP3:** Fosfatidilinositol (3,4,5)-trisfosfato.
- **PpIX:** Protoporfirina IX.
- **PTEM:** Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-Fosfatasa.
- **Rab:** Miembro de la familia de oncogenes Ras.
- **Rapa:** Rapamicina.
- **Ras:** Proteína con Actividad GTPasa.
- **RBAc:** Rosa de bengala (fotosensibilizador).
- **RE:** Reticulo Endoplasmático.

- **RFP:** Proteína Roja Fluorescente.
- **Rheb:** Homólogo de Ras enriquecida en cerebro.
- **RIP-1:** Receptor de Interacción a la serina/treonina quinasa 1.
- **SAGE:** Sociedad Argentina de Gastroenterología.
- **Smac/DIABLO:** Segundo Activador de Caspasas Derivado de Mitocondrias (Smac)/ Inhibidor Directo de proteína de unión a apoptosis con bajo pi (DIABLO).
- **SNF:** Proteína de fusión sensible N-etilmaleimida.
- **Stv:** Ayuno.
- **TCR:** Receptores de Células T.
- **TFD:** Terapia Fotodinámica.
- **TGF- α :** Factor de crecimiento y transformación alpha.
- **TNF-RI:** Receptor 1 del Factor de Necrosis Tumoral
- **TNF- α :** Factor de Necrosis Tumoral alpha
- **TRAIL-R:** Receptor del Ligando Inductor de Apoptosis asociado a TNF.
- **TSC1/2:** Proteína 1/2 de esclerosis tuberosa.
- **T-SNARE:** “*SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor*” (Target).
- **ULK 1/2:** “*unc-51 like autophagy activating kinase*”.
- **UVRAG:** Gen Supresor Tumoral Asociado a Resistencia a Radiación UV.
- **VA:** Vesículas Autofágicas.
- **Vam:** Proteína asociada a la membrana de la familia MAGUK.
- **VCP:** Proteína Conteniendo Valosin.
- **VEGF:** Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular.
- **VMP1:** Proteína de Membrana Vacuolar.
- **Vps:** “*Vacuolar Proteins Sorting*”.
- **V-SNARE:** “*SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) REceptor*” (Vesicular).
- **WIPI:** Proteína conteniendo un dominio repetido WD.
- **WM:** Wortmanina.
- **Z-Green:** Proteína Verde Fluorescente derivada de *Zoanthus* sp.



INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

1. CÁNCER

La multiplicación de las células se encuentra cuidadosamente regulada y responde a necesidades específicas del organismo. Los mecanismos que controlan esta multiplicación rara vez son alterados. La violación de dichos controles por parte de una célula culmina en la proliferación descontrolada. Este punto, junto con la colonización tisular, son las propiedades que caracterizan al conjunto de enfermedades denominadas Cáncer.

Se considera que la causa del cáncer es netamente genética, pero esta es una situación distinta a la de las enfermedades genéticas clásicas, ya que se originan en células somáticas con peculiaridades dependientes del tipo de célula donde se origina, sus causas y su mecanismo, el grado de malignidad y otros factores. Se manifiesta en alteraciones bioquímicas de todo tipo a nivel celular, tisular y particularmente, por la aparición de marcadores tumorales (Grille et al. 2003).

Estas alteraciones genéticas pueden ser mutaciones, causadas tanto por agentes cancerígenos como por errores espontáneos o inducidos en la replicación y reparación del ADN, o bien, ser cambios epigenéticos que modulen la expresión de genes involucrados en la proliferación o muerte celular. El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo, luego de las enfermedades cardiovasculares. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC) en 2012 se produjeron 14.1 millones de nuevos casos de cáncer en el mundo. 7,4 millones (53%) en hombres y 6,7 millones (47%) en mujeres, siendo los tipos de cáncer más comunes los de pulmón, mama (en mujeres), intestino y próstata que en conjunto constituyen el 42% del total de nuevos casos diagnosticados (Ferlay et al. 2014). La incidencia de esta enfermedad y su mortalidad se incrementan en el mundo, debido al aumento de la población mundial, elevación de la esperanza de vida y una mayor exposición a los factores de riesgo (según datos de OMS).

1.1 Características de las células cancerosas

Las células cancerígenas poseen las siguientes características particulares:

- Resistencia a la muerte celular: las células emplean una variedad de estrategias que bloquean las señales de muerte celular apoptótica.
- Continua proliferación: las células son capaces de mantener una continua señalización mitogénica, evadir supresores de crecimiento y evadir los mecanismos de inhibición por contacto.
- Movilidad: las células tumorales son capaces de alterar su anclaje con otras células así como con la matriz extracelular confiriendo la capacidad de abandonar su lugar inicial e invadir nuevos tejidos.
- Subversión: es la capacidad de inhibir el sistema inmune e influir sobre las células normales a los fines de crear un ambiente propicio para el desarrollo del tumor.
- Inestabilidad: es característico que la mayoría de los clones malignos originan diversos subclones que acumulan aún más mutaciones en el genoma.
- Reprogramación del metabolismo energético: incluso en presencia de oxígeno, las células cancerígenas pueden reprogramar su metabolismo de la glucosa limitando su producción energética a la glucólisis (mecanismo conocido como “glucólisis aeróbica”)
- Inducción de angiogénesis: los tumores poseen la capacidad de inducir el crecimiento de vasos sanguíneos secretando factores proangiogénicos, así como también promoviendo la secreción de los mismos por parte de su microentorno (Hanahan & Weinberg 2011)

1.2 Desarrollo del cáncer

1.2.1 Formación del tumor primario

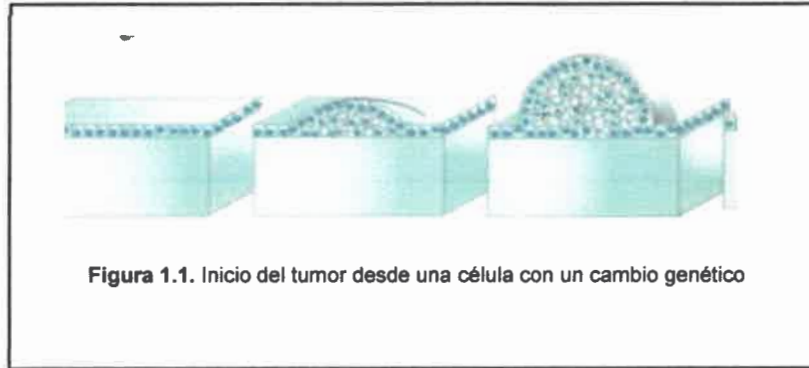
Etapa llamada tumorigénesis, se inicia con la llamada “célula progenitora del cáncer”.

Se ha propuesto que el proceso de iniciación depende de la aparición de mutaciones (Alberts et al. 2002).

La aparición de una célula tumoral depende además de la pérdida del reconocimiento por parte del sistema inmune de ésta como célula anómala.

En general, en un estadio inicial no se produce daño significativo y la extirpación quirúrgica puede ser empleada para remover el tejido tumoral, logrando, en la mayoría de los casos, la cura de la enfermedad.

En este estadio, las células específicas del tumor no difieren sustancialmente de la estructura de las células normales.



Si bien no se produjo invasión de tejidos adyacentes, al incrementar su tamaño, el tumor puede causar serios problemas por ejercer presión sobre otros órganos o al secretar de forma excesiva sustancias que normalmente secretan las células del tejido de origen (por ejemplo: hormonas) (Figura 1.1) (Alberts et al. 2002)

1.2.2 Invasión y metástasis:

Las células cancerosas desarrollan alteraciones en su forma, así como en su adhesión a otras células y con la matriz extracelular (ECM). Típicamente, los genes que codifican moléculas de adhesión célula-célula, célula-matriz extracelular se encuentran “suprimidos” en tumores altamente malignos. Por otro lado las moléculas de adhesión relacionadas con la migración celular se “sobre-expresan”. El resultado, son células capaces de desprenderse de tu tejido original y migrar a regiones adyacentes o distantes del mismo (Hanahan & Weinberg 2011).

Esta etapa se puede dividir en varias sub-etapas:

- Escape celular o invasividad,
- Angiogénesis,
- Metástasis.

1.2.2.1 Escape celular o invasividad

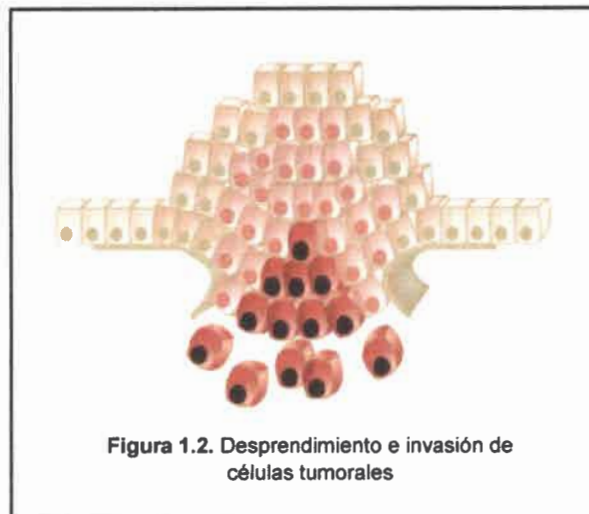
La restricción de un tipo celular a un órgano o tejido dado se mantiene debido al reconocimiento entre las células y las barreras físicas.

Una célula normal se encuentra doblemente adherida, gracias a uniones intercelulares como las uniones adherentes, desmosomas, uniones estrechas; y uniones de las células con la matriz extracelular (MEC) como los contactos focales y hemidesmosomas.

En estas interacciones están involucradas proteínas como las cadherinas, las cateninas e integrinas, que participan además como componentes de vías de supervivencia.

Ambos tipos de adhesión están alteradas en el cáncer, siendo esta alteración responsable del desprendimiento y movilidad de una célula a un nuevo sitio (**Figura 1.2**).

La movilidad celular también depende de la degradación de la matriz extracelular, con este fin las células cancerígenas son capaces de secretar enzimas proteolíticas que degradan dicha estructura (colagenasas, metaloproteasas) (Grille et al. 2003).



1.2.2.2 Angiogénesis

Para el crecimiento adecuado del tumor, es necesaria la formación de nuevos vasos sanguíneos que lo nutran adecuadamente. Sin esta irrigación, un tumor no podría superar un diámetro mayor de 2 mm, punto en el cual la división de las células exteriores se equilibra con la muerte de las centrales, debido al suministro inadecuado de nutrientes.

Si bien el proceso de angiogénesis no ha sido claramente dilucidado, puede considerarse constituido por tres etapas: 1-la degradación de la lámina basal que rodea al capilar cercano, 2- la división de las células endoteliales, 3- la formación de una nueva membrana basal en torno al capilar recién formado.

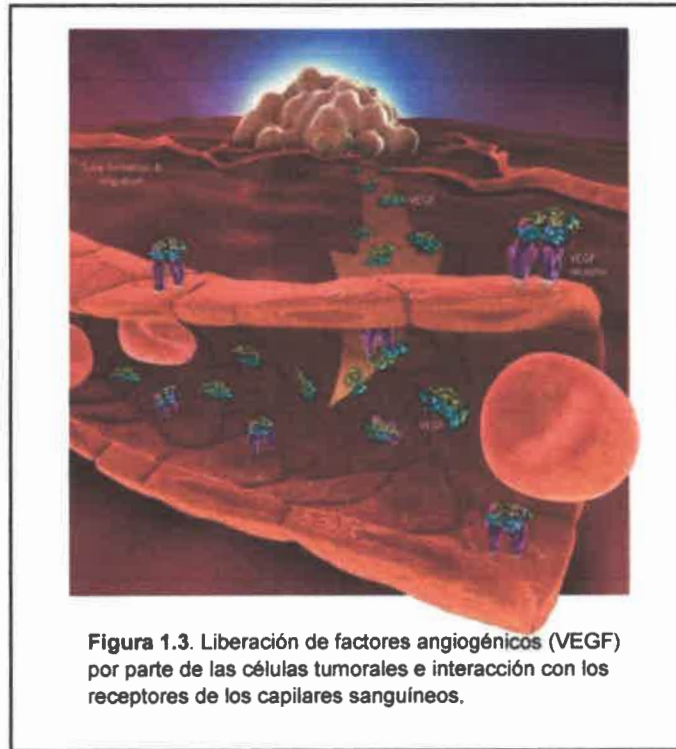


Figura 1.3. Liberación de factores angiogénicos (VEGF) por parte de las células tumorales e interacción con los receptores de los capilares sanguíneos.

La estimulación de este proceso se debe a la liberación de factores angiogénicos, tales como el factor básico de crecimiento de fibroblastos (BFGF), el factor de crecimiento y transformación alfa (TGF- α) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), ya sea por parte de las células tumorales o las células circundantes (**Figura 1.3**).

La presencia de estos nuevos vasos sanguíneos resulta en la nutrición adecuada del tumor en crecimiento, lo que le permite aumentar su tamaño incrementando las posibilidades de aparición de mutaciones que favorezcan del desarrollo maligno.

Uno de los aspectos más misteriosos de la angiogénesis es la frecuente secreción, por parte de los tumores, de sustancias que inhiben el proceso alrededor de las metástasis secundarias. En este caso la extirpación quirúrgica del tumor primario puede estimular la proliferación de los tumores secundarios (Alberts et al. 2002).

La angiogénesis es uno de los objetivos de los tratamientos anticancerosos actuales, haciendo uso de la existencia de proteínas como endostatina y angiostatina (Grille *et al.* 2003).

1.2.2.3 Formación del tumor secundario: metástasis

Mediante la invasión o diseminación celular, las células del tumor primario pueden fijarse en tejidos normales para multiplicarse y diferenciarse en ellos, dando lugar al llamado tumor secundario o metástasis. Esta etapa es de enorme gravedad clínica, porque supone la destrucción del tejido sano que rodea a las células tumorales y la consiguiente dificultad de eliminación por intervención quirúrgica.

El proceso metastásico depende de un conjunto de eventos fundamentales. En primer lugar debe haber disminución y aumento de la adhesión. Las moléculas que disminuyen sus niveles permiten a las células separarse de sus vecinas (ejemplo: E-cadherinas, b-cateninas e integrinas), mientras que las moléculas que aumentan de concentración permiten a las células anclarse a la matriz extracelular a medida que se produce la migración. Simultáneamente debe haber destrucción de la membrana basal.

En segundo lugar las células deben migrar hasta un vaso sanguíneo (o linfático), intravasarse, ser transportada por la corriente sanguínea hasta lechos capilares distales, extravasarse y migrar una cierta distancia para iniciar la formación de una nueva colonia de células cancerosas (**Figura 1.4**) (Anon 2000).

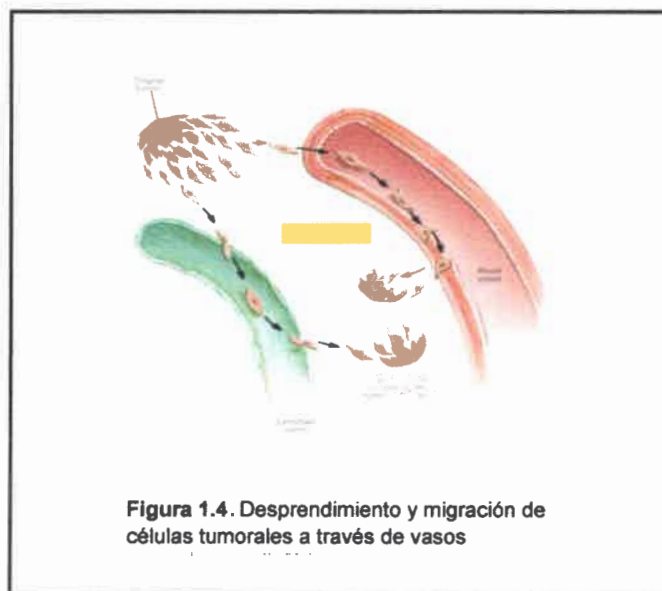


Figura 1.4. Desprendimiento y migración de células tumorales a través de vasos

1.3. Bases moleculares: genes responsables del cáncer

Las mutaciones presentes en las células cancerosas que provocan la aparición de características tumorales afectan a genes cuyos productos proteicos regulan la proliferación o muerte (Grille *et al.* 2003). Estos cambios son los responsables de las diferencias observadas entre las células normales y las tumorales: control de la proliferación, morfología, interacciones intercelulares, propiedades de la membrana, estructura del citoesqueleto, secreción de proteínas y expresión génica.

Existen 2 clases de genes involucrados en el control del crecimiento y proliferación celular, por lo que mutaciones en estos genes son responsables de la ruptura del equilibrio entre división celular/muerte celular.

1.3.1 Oncogenes y genes oncosupresores

Se denomina oncogen a la forma mutada de un gen normal (en la mayoría de los casos) que causa cáncer como consecuencia de una ganancia en la función de la proteína mutante. El proto-oncogén codifica una proteína normal, generalmente relacionada con la proliferación celular o la apoptosis, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas (ejemplo: el gen *ras*). La forma de oncoproteína se mantiene constitutivamente activa. Debido a que la mutación produce ganancia en la función, los oncogenes se expresan con carácter dominante (Lodish *et al.* 2000)(Grille *et al.* 2003).

Se denomina gen oncosupresor, a los genes que causan cáncer como resultado de una mutación con pérdida de función. La forma normal de la proteína o proteína oncosupresora, detiene la proliferación o estimula la apoptosis. Una vez mutada la proliferación deja de estar controlada y la apoptosis nunca tiene lugar.

A diferencia de los oncogenes en donde un solo alelo mutante afecta al fenotipo de la célula, la pérdida de la función de un gen oncosupresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos. Es decir que el fenotipo se expresa con carácter recesivo (Lodish *et al.* 2000)(Grille *et al.* 2003).

1.4 Cáncer de Colon

El cáncer de colon y recto, llamado cáncer colorrectal (CCR), se debe al crecimiento de células de la mucosa colónica que se convierten en malignas o cancerosas por una compleja interacción entre factores hereditarios y ambientales. Es el tercer cáncer más frecuente en Argentina, luego del cáncer de mama y próstata. Según la IARC (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer – OMS), en Argentina se produjeron 11.000 nuevos casos en 2008 de los cuales 5.800 fueron hombres y 5.200 en mujeres (Ferlay et al. 2010).

Así mismo, en nuestro país el CCR causó 6.816 muertes en 2010, el 11.7% del total de muertes por tumores malignos, ubicándose en el segundo lugar luego del cáncer de pulmón con 9.004 muertes y precediendo al cáncer de mama que produjo 5.529 defunciones (Dirección de estadísticas e Información de Salud –DEIS- Información básica año 2010) (Ferlay et al. 2010).

Este tipo de cáncer se desarrolla normalmente a partir de pólipos precancerosos (80-90% de los casos), llamados pólipos adenomatosos. Un pólipo es una tumoración o protuberancia de la pared del colon que crece hacia la luz del órgano. Los pólipos crecen durante muchos años, la mayoría de las personas no los desarrollan sino a partir de los 50 años (SAGE, sociedad argentina de gastroenterología).

La lenta progresión del adenoma hacia el cáncer favorece las estrategias de pesquisa y permite un diagnóstico más temprano y un tratamiento más efectivo.

En Argentina, a través del Instituto Nacional de Cáncer se decidió encarar el proceso de elaboración de un programa destinado a la implementación de acciones sistemáticas tendientes a la prevención y detección temprana del CCR (Ubaldo Alfredo Gualdrini, 2012).

1.4.1 Clasificación del cáncer de Colon

EL desarrollo del CCR puede dividirse en diferentes estadios o etapas:

Estadio 0: El tumor se encuentra solo en el epitelio del colon o el recto.

Estadio I: El tumor ha atravesado la pared del colon o el recto.

Estadio II: El tumor se extiende con más profundidad a través de la pared del colon o recto. Puede haber invasión de tejido cercano pero las células cancerosas no se han diseminado a los ganglios linfáticos.

Estadio III: el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos pero no a otras partes del cuerpo.

Estadio IV: el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo como el hígado y los pulmones.

Cáncer recurrente: es el cáncer que ha sido tratado y reaparecido, puede reaparecer en el colon, recto o en otra parte del cuerpo (INC, 2008).

1.4.2 Tratamientos

La selección del tratamiento depende principalmente de la ubicación del tumor en el colon o el recto y del estadio de la enfermedad. El tratamiento para el CCR puede incluir cirugía, quimioterapia, terapia biológica o radioterapia. Algunos pacientes reciben una combinación de tratamientos. Muchas veces el cáncer de colon se trata de forma diferente al cáncer de recto (INC, 2008).

La cirugía es usualmente el tratamiento inicial para los cánceres de colon que no se han propagado a sitios distantes. En los casos de uso de terapias adyuvantes como quimio o radioterapia, estas se utilizan por un periodo de 6 meses (INC, 2008).

1.4.2.1 **Estadio 0:**

Se realiza cirugía para extirpar el cáncer. Se logra por polipeptomía o escisión local a través de un colonoscopio. Si el tumor es demasiado grande puede ser necesaria una colectomía (escisión del colon).

1.4.2.2 **Estadio I:**

No hay propagación hacia el ganglio, se realiza colectomía parcial. No se necesitan terapias adicionales.

En ocasiones si no se está seguro de haber extirpado toda la masa tumoral se puede recomendar radioterapia para tratar de destruir cualquier célula tumoral remanente.

1.4.2.3 Estadio III:

El tratamiento convencional consiste en la cirugía (colectomía parcial) seguida de quimioterapia adyuvante. El régimen FOLFOX (5-FU, leucovorín, y oxaliplatino) es la combinación de quimioterapia más común, aunque algunos médicos pueden preferir 5-FU y leucovorín, o capecitabina sola según la edad y estado de salud del paciente. También se puede realizar radioterapia luego de la cirugía si se sospecha que quedaron células cancerosas sin extraer.

1.4.2.4 Estadio IV:

En la mayoría de los casos es poco probable que la cirugía cure estos cánceres. Sin embargo si solo hay presentes pocas y pequeñas áreas de propagación (metástasis) en el hígado o pulmones se pueden extirpar completamente junto con el cáncer de colon. Usualmente también se administra quimioterapia después y/o antes de la cirugía.

Si las metástasis no se pueden extirpar quirúrgicamente debido a que son muy grandes o numerosas, se puede tratar primero con quimioterapia para reducir el tamaño de los tumores con el fin de permitir la cirugía. Entonces, se puede administrar nuevamente quimioterapia después de la cirugía. Otra opción sería destruir los tumores en el hígado con criocirugía, ablación por radiofrecuencia u otros métodos no quirúrgicos.

La mayoría de los pacientes con cáncer en etapa IV recibirá quimioterapia y/o terapias dirigidas para controlar el cáncer.

La selección de los regímenes puede depender de varios factores, incluyendo cualquier tratamiento previo y la salud general del paciente. Si uno de estos regímenes ya no surte efecto, se puede implementar otro (ACS, 2013).



CAPITULO 2

2. TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS

Actualmente científicos de todo el mundo buscan mejores herramientas para el tratamiento de las enfermedades oncológicas.

Un tratamiento eficaz debe dirigirse no sólo al tumor principal, sino también a los tumores que puedan aparecer, por extensión, en otras partes del organismo (Prucca, 2006).

Una estrategia terapéutica convencional, consiste en la combinación de tratamientos como radioterapia y cirugía, en conjunto con la quimioterapia. Las primeras actúan sobre el tumor principal, mientras que con la segunda se puede alcanzar las metástasis. Los tratamientos actuales apuntan principalmente a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

La respuesta a la terapia y la elección de la respuesta terapéutica depende del tipo de cáncer y del estado y evolución de la patología. Algunos cánceres tienen una buena respuesta a los tratamientos, otros mejoran pero no se curan. Otros pueden tener una excelente respuesta inicial pero después de repetidos tratamientos desarrollan resistencia. Esta resistencia se debe a la expresión de genes que protegen a las células (normales o cancerosas) del efecto de determinados agentes citotóxicos.

La resistencia tumoral a las diferentes terapias, es responsable, en última instancia, de la elevada tasa de muerte de pacientes con cáncer.

Algunas de las terapias actualmente utilizadas en la clínica oncológica son: cirugía, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, inmunoterapia, terapia fotodinámica, etc.

2.1 Cirugía

Consiste en la extirpación quirúrgica del tumor. Es la forma más antigua de tratamiento del cáncer. El tratamiento y las perspectivas son determinados principalmente por el estudio de la gravedad del cáncer y su extensión a otros órganos. En sus estadios iniciales, el cáncer puede ser curado solo con este tratamiento.

2.2 Quimioterapia

En términos generales, la quimioterapia es cualquier tratamiento médico basado en la administración de sustancias químicas (fármacos).

El término quimioterápicos suele reservarse a los fármacos empleados en el tratamiento de las enfermedades neoplásicas que tienen como función impedir la proliferación de las células cancerosas.

Los agentes quimioterápicos actúan interfiriendo en los procesos fisiológicos de la proliferación celular. Sus principales blancos son la síntesis de ADN, ARN y proteínas, inhibiendo las enzimas involucradas en estas vías metabólicas. Sin embargo, otros agentes interfieren con los mecanismos de reparación del ADN, producen la rotura de la cadena o simplemente impiden el ensamblaje de los microtúbulos, ocasionando la muerte celular (Arvelo y Cotte, 2000)(Stockler et al. 2000).

Los agentes quimioterapéuticos se pueden clasificar en fase-específicos, los cuales sólo son eficaces sobre las células que se encuentran en una determinada fase del ciclo celular y el aumento de la dosis no se correlaciona con un aumento de la destrucción celular o no fase-específicos, los que son activos en cualquier fase del ciclo celular, y por lo tanto, suelen tener una curva dosis-respuesta lineal. La quimioterapia no sólo disminuye la masa del tumor primario, sino que también elimina las células tumorales circundantes y metastásicas.

Los principales agentes citostáticos se pueden agrupar de la siguiente manera: agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos antitumorales, alcaloides vegetales, taxoles, entre otros. Si bien la quimioterapia ha sido un arma eficiente, pocos son los tumores malignos en estado avanzado curables por la misma, a pesar de los avances logrados en los tratamientos (Prucca, 2006).

El tratamiento quimioterápico puede deteriorar físicamente a los pacientes con cáncer. Los agentes quimioterápicos destruyen también las células normales sobre todo las que se dividen más rápidamente, por lo que los efectos secundarios están relacionados con este fenómeno.

2.3 Radioterapia

La radioterapia es una forma de tratamiento basada en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa).

Se lleva a cabo habitualmente con un equipo denominado acelerador lineal. Los rayos se aplican muy cerca del tumor y el grado en que los rayos afectarán adversamente a los tejidos normales depende del tamaño del área irradiada y de su proximidad a los tejidos sanos.

La radioterapia es muy efectiva para el tratamiento de muchos cánceres como la enfermedad de Hodgkin y el cáncer de células escamosas de la cabeza y cuello.

La radioterapia puede reducir los síntomas cuando el cáncer no tiene posibilidades de curación como en los cánceres avanzados de cerebro. Además puede aliviar los síntomas causados por la metástasis en los huesos o en el cerebro.

La radioterapia tiene como blanco principal las células que se dividen activamente. Esto quiere decir que afecta principalmente a las células tumorales pero también aquellas que normalmente se multiplican como las células epiteliales. Es necesario precisar al máximo el foco de irradiación ya que esto es lo que más protege a las células normales.

La susceptibilidad a la radiación depende de la adecuada oxigenación de las células. A las células cercanas al centro de un tumor de gran tamaño, a veces les llega poca irrigación sanguínea y por lo tanto pocos niveles de oxígeno. A medida que el tumor se hace más pequeño, las células supervivientes parecen obtener un mayor suministro de sangre lo cual las hace más vulnerables a las próximas dosis de radiación. Así, repartiendo la radiación en dosis repetidas durante un periodo prolongado, aumenta el efecto letal sobre las células del tumor y disminuye el efecto tóxico sobre las células normales (Prucca, 2006).

2.4 Terapia hormonal

Esta terapia aumenta o disminuye la cantidad de ciertas hormonas, limitando así el crecimiento de los cánceres que dependen de estas hormonas o que están inhibidas por ellas. Por ejemplo, algunos tipos de cánceres de mama necesitan estrógenos para crecer.

El tamoxifeno es un fármaco antiestrogénico, que bloquea los efectos de los estrógenos y así puede reducir la propagación de células neoplásicas cuyo crecimiento depende de la hormona. De igual manera el cáncer de próstata se puede tratar con estrógenos (Stockler et al. 2000).

2.5 Inmunoterapia

La inmunoterapia se basa en la estimulación del propio sistema inmune del paciente para que sea capaz de reconocer y eliminar las células tumorales.

2.5.1 Inmunoterapia basada en células dendríticas

Ésta modalidad terapéutica utiliza las células dendríticas para activar una respuesta citotóxica hacia un antígeno. Las células dendríticas, son células presentadoras de antígeno obtenidas del paciente. Luego, estas células son activadas con un antígeno o transfectadas con un vector viral. Las células dendríticas activadas son reimplantadas en el paciente, en donde presentan los antígenos a los linfocitos efectores (células T CD4+, células T CD8+, células dendríticas especializadas y células B). Esto inicia una respuesta citotóxica que ocurre contra estos antígenos. La activación con antígenos tumorales, permite al sistema inmune reconocer células cancerosas (Palucka & Banchereau 2012).

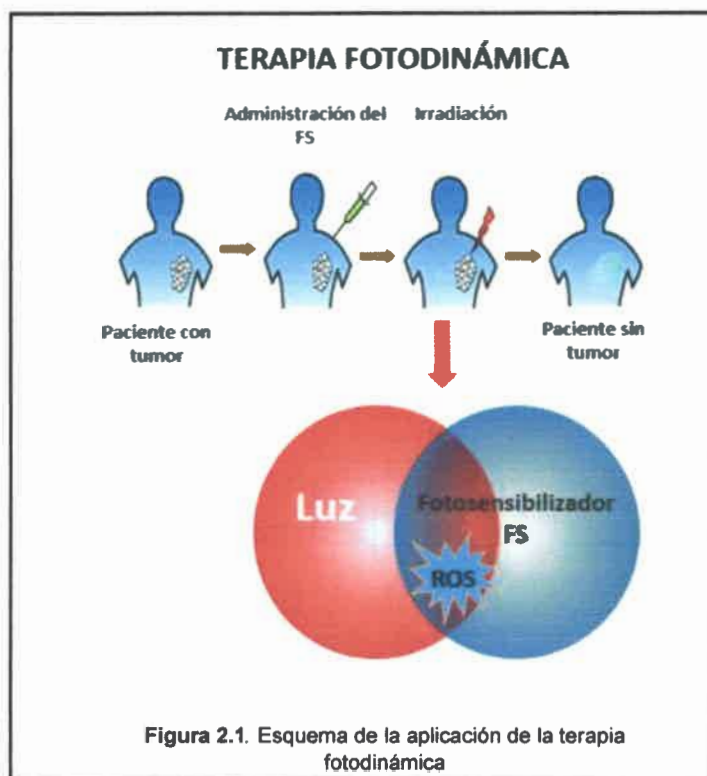
2.5.2 Inmunoterapia basada en células T

Esta terapia usa las respuestas citotóxicas basadas en células T para atacar células tumorales. En resumen, las células T que tienen una reactividad natural o manipulada genéticamente al cáncer, son expandidas *in vitro* usando una variedad de métodos y luego reimplantadas en el paciente. Estas células T reactivas pueden encontrarse infiltradas en los propios tumores del paciente. Estos linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) proliferan *in vitro* usando altas concentraciones de interleucina-2 (IL-2), anti-CD3 y alimentadores alorreactivos y luego son transferidas de nuevo al paciente junto con la administración exógena de IL-2. Las células T manipuladas, se obtienen

incorporando a su genoma (por ejemplo, mediante infección viral), receptores de células T (TCR) que han sido identificados por tener reactividad contra los antígenos asociados a tumores. Los linfocitos propios de un paciente son infectados con estos vectores virales y luego expandidos específicamente. Las células son entonces transferidas de nuevo al paciente (Kalos & June 2013).

2.6 Terapia Fotodinámica

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica relativamente nueva, mínimamente invasiva, aprobada para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas, la cual involucra la activación por luz y en presencia de oxígeno de ciertas drogas llamadas fotosensibilizadores (FS) que han sido selectivamente tomadas por el tejido diana. Los FS son compuestos que absorben la energía de la luz e inducen reacciones en otras moléculas no absorbentes. Además, todos los componentes (FS, luz y oxígeno) deben estar presentes para que ocurra la muerte celular (Agostinis et al. 2011a)(Buytaert et al. 2007). Los FS pueden ser administrados de manera intravenosa o tópica, como en el caso del tratamiento de afecciones de la piel (Dolmans et al. 2003).



Transcurrido un determinado tiempo se procede a la irradiación del fotosensibilizador localizado en la zona a tratar. La activación del FS da lugar a reacciones fotoquímicas que conducen a la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (EROs), como es el caso del oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), que causan la muerte de las células tratadas (Dolmans et al. 2003) (Figura 2.1).

El concepto de TFD aparece con los estudios de Oscar Raab en 1900 sobre los efectos de la luz y colorantes sobre paramecios. La era moderna de la TFD comienza con los estudios de Lipson y Schwartz en 1960, quienes observaron que la inyección de preparaciones de hematoporfirinas llevaba a la fluorescencia de lesiones neoplásicas que podían ser visualizadas durante las cirugías. Desde entonces se han realizado numerosos trabajos con la finalidad de aumentar la eficiencia de la TFD y utilizarla como tratamiento contra tumores humanos (Daniell & Hill 1991), esfuerzos que culminaron con la aprobación del primer FS para uso clínico, Photofrin, aprobado en Canadá para el tratamiento de cáncer de vejiga y en Francia, Alemania, Japón entre otros para el tratamiento de cáncer de pulmón, tracto digestivo y tracto genitourinario; en USA ha sido aprobado para el tratamiento de cáncer de esófago (Sibata et al. 2001). Dentro de las principales ventajas de la acción terapéutica de la TFD sobre otros tratamientos de cáncer más convencionales, se encuentran:

- 1) Su escasa toxicidad sistémica, debido a la preferente acumulación del compuesto FS en células tumorales,
- 2) Su habilidad para destruir selectivamente a las células tumorales, ya que su efecto citotóxico sólo ocurre tras la irradiación con luz del área tumoral en la que se ha acumulado el FS,
- 3) La posibilidad de aplicar la TFD sola o en combinación con otros tratamientos del cáncer, incluidos la quimioterapia, la radioterapia y la inmunoterapia.
- 4) La ausencia de efectos mutagénicos, permitiendo además mantener indemnes los tejidos sanos adyacentes. Además, el compuesto FS tiene la ventaja de poder ser administrado por vía sistémica o mediante aplicación tópica, en función de la localización del tumor (González-Peramato et al. 2008).

2.6.1 Mecanismos de la TFD

Luego de la absorción de luz, el FS se transforma desde su estado basal P_0 (singlete), a un estado P_1 (tripleto) (Dougherty et al. 1998). En este estado puede sufrir dos clases de reacciones. En primer lugar, el mecanismo denominado de tipo I, el FS puede reaccionar directamente con el sustrato (como proteínas, lípidos e hidratos de carbono de las células) y transferir un electrón para formar radicales libres, los cuales interactúan para producir productos oxidados.

Según el mecanismo de tipo II, el FS en su estado tripleto puede transferir su energía directamente al oxígeno y de esa forma dar lugar a la formación de 1O_2 (Sharman et al. 2000)(González-Peramato et al. 2008).

Ambos tipos de mecanismos ocurren simultáneamente y la proporción de dichos procesos dependerá del tipo de FS utilizado, la concentración del sustrato y del oxígeno, como así también de la afinidad del fotosensibilizador por el sustrato (González-Peramato et al. 2008).

Se acepta, de forma general, que el oxígeno singlete (la forma más reactiva del oxígeno) es el principal causante de daño durante la TFD. Sin embargo cabe aclarar que esto es cierto en condiciones oxigenadas mientras que en condiciones hipóxicas prevalecen las reacciones de tipo I (González-Peramato et al. 2008).

El grado de fotodaño y la citotoxicidad es un proceso multifactorial y depende del tipo de fotosensibilizador, su ubicación, la dosis total administrada, la dosis de luz aplicada como también su longitud de onda, la disponibilidad de oxígeno y el tiempo que transcurre entre la administración del fotosensibilizador y la exposición a la luz. Todos estos factores modulan el rol de tres procesos independientes que contribuyen a la eficiencia de la destrucción tumoral inducida por TFD: 1-muerte directa de células tumorales, 2-destrucción de la vasculatura tumoral y 3-activación de la respuesta inmunológica (Buytaert et al. 2007)(González-Peramato et al. 2008). Se ha demostrado que la TFD puede destruir células tumorales directamente por la inducción eficiente de vías de muerte celular apoptóticas y no apoptóticas.

A nivel molecular la destrucción tumoral es causada por el fotodaño irreversible de estructuras subcelulares vitales, las cuales incluyen la membrana plasmática y las membranas intracelulares de las mitocondrias, lisosomas, retículo endoplasmático y

aparato de Golgi. La mayoría de los FS no se acumulan en el núcleo, por lo que la TFD tiene, en general, mucho menos potencial de causar daño en el ADN, mutaciones y carcinogénesis comparada con las radiaciones-X. Se considera que la localización intracelular del FS coincide con el sitio primario de fotodaño, debido a la vida corta y difusión limitada del $^1\text{O}_2$ en los sistemas biológicos (Buytaert et al. 2007) siendo la vida media de tan sólo 0.04 μs , y su radio de acción de 0.02 μm . Por ello, sólo las células y tejidos que estén muy cerca de los lugares de generación de EROs serán los inicialmente dañados (González-Peramato et al. 2008).

La naturaleza molecular de los blancos foto-oxidados tiene una profunda influencia sobre la vía de señalización y el modo de muerte celular iniciada luego de la TFD, así los FS localizados en mitocondrias y Retículo Endoplasmático (RE) promueven principalmente apoptosis, mientras que los localizados en membranas plasmáticas o lisosomas pueden bloquear la vía apoptótica predisponiendo a la muerte celular por necrosis. Evidencias recientes, además, indican que la autofagia puede ser inducida por la TFD en un intento de reparar y sobrevivir al fotodaño (Buytaert et al. 2007).

Luego de la aplicación de TFD, se ha observado en el microambiente tumoral, injuria vascular, hipoxia tisular y reacciones inflamatorias así como también la expresión simultánea de factores de crecimiento, metaloproteínas de matriz, citoquinas y prostaglandina. Estas respuestas relacionadas al tratamiento pueden ser asociadas con un fenotipo angiogénico y/o de supervivencia que puede jugar un rol en la reaparición del tumor posterior al tratamiento con TFD (Jiang et al. 2004)(Ferrario & Gomer 2010), **esto resalta la necesidad de entender la respuesta molecular iniciada por TFD.**

2.6.2 Inducción de apoptosis por TFD

La apoptosis es un proceso de muerte celular dependiente de ATP, caracterizado morfológicamente por condensación de la cromatina, clivaje del ADN cromosómico en fragmentos nucleosomales, encogimiento celular, formación de cuerpos apoptóticos, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática y reconocimiento de la célula apoptótica por células fagocíticas vecinas. A nivel molecular, la apoptosis conlleva la activación de proteasas llamadas caspasas (Lodish et al. 2000).

Las caspasas actúan en dos vías convergentes llamadas intrínseca o extrínseca, en las cuales los iniciadores, caspasa-9 y caspasa-8/-10 respectivamente, activan directamente al efector procaspasa-3 y -7. La vía extrínseca es iniciada por la unión de los ligandos de muerte (ej. FasL, TNF- α) a sus receptores de muerte de superficie celular (DR) (ej. TNF-RI, TRAIL-R). La unión del ligando al receptor produce su multimerización e interacción con el adaptador FADD, luego se forma el complejo de señalización inductor de muerte (DISC), este complejo recluta al iniciador procaspasa-8 y -10, lo que resulta en su dimerización y activación. Caspasa-8/-10 a su vez clivan a los efectores caspasa-3 y -7 llevando a la apoptosis (Lodish et al. 2000).

En la vía intrínseca, la mitocondria ocupa un rol esencial. Una gran parte de los estímulos apoptóticos como el estrés celular, radiaciones, agentes oxidantes etc, utilizan esta ruta de señalización regulada principalmente por las proteínas de la familia Bcl-2 (Iracheta 2007). Las proteínas mitocondriales son importantes constituyentes de la maquinaria apoptótica, entre estas se incluyen activadores de apoptosis como el citocromo c, Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO, así como también el factor inductor de apoptosis (AIF) y la endonucleasa G (EndoG). Tanto AIF como EndoG actúan en una forma de muerte independiente de caspasas. El citocromo c citosólico, por unión a Apaf-1 y en presencia de ATP o dATP, recluta y activa a procaspasa-9 a través de la formación del apoptosoma. Omi/HtrA2 y Smac/DIABLO antagonizan con los inhibidores apoptóticos endógenos (IAPs), además la translocación al interior del núcleo, de AIF y EndoG, provoca la condensación de la cromatina y fragmentación del ADN a larga escala independientemente de la señalización de caspasas (Lodish et al. 2000).

La liberación de las proteínas mitocondriales implica un aumento de la permeabilidad de la membrana de esta organela. Esto puede deberse, por un lado, a un repentino incremento de la permeabilidad de la membrana a solutos de un peso molecular superior a 1.5 KDa, permitiendo la entrada a la matriz mitocondrial de iones y otros solutos, con la consecuente pérdida del potencial de membrana y aumento del potencial osmótico, provocando la ruptura de la membrana externa y liberación de factores apoptogénicos. Un segundo mecanismo que explica el aumento de la permeabilidad mitocondrial, es la formación de canales proteínicos en la membrana externa de la mitocondria, a través

de un proceso que involucra la oligomerización de miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 o interacción de estos con los canales dependientes de voltaje (VDCA).

La familia Bcl-2 comprende unos 20 miembros que contienen uno de cuatro dominios de homología a Bcl-2 (BH1-BH4). La familia Bcl-2 incluye a proteínas pro y anti-apoptóticas, entre las anti-apoptóticas se incluyen Bcl-2, Bcl-XL y Bcl-w, las cuales contienen los cuatro dominios y se encuentran en el lado citoplasmático de la membrana mitocondrial, retículo endoplásmico y núcleo (Lodish et al. 2000). Las proteínas Bcl-2 pro-apoptóticas pueden ser divididas de la siguiente manera, las multidominio (BH 1, 2, 3) como Bax y Bak y las proteínas solo-BH3 (sólo poseen BH3) como Bid y Bad. En células no apoptóticas, Bax se encuentra como un monómero citosólico; bajo un estímulo apoptótico, cambia su conformación y se inserta en la membrana externa mitocondrial, donde se oligomeriza y induce la formación de poros en la membrana de la mitocondria. Si bien el mecanismo exacto de la activación de Bax y Bak no se conoce, se sabe que puede ser inhibido por los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Estas proteínas pueden relacionarse con la resistencia a TFD (Buytaert et al. 2007). Numerosos estudios han demostrado que la sobre-expresión de Bcl-2 y Bcl-XL puede ser responsable de la quimio y radio-resistencia (Buytaert et al. 2007). Por lo tanto, un cambio en el balance entre la actividad de los miembros de la familia Bcl-2 pro- y anti-apoptóticos podría ser responsable de la susceptibilidad de las células a la apoptosis inducida por TFD (Carvalho et al. 2004).

El entrecruzamiento molecular entre la vía extrínseca y la vía intrínseca, es producido por el clivaje de Bid mediado por caspasa-8, que en su forma truncada, tBid, trasloca hacia la mitocondria y facilita la liberación del citocromo c hacia el citosol (Lodish et al. 2000)(Almeida, 2004)

El rol crítico de la vía mitocondrial en la activación de caspasas ha sido fuertemente documentado. En estudios empleando TFD se ha observado que luego del estímulo fotodinámico, se produce la liberación del citocromo c, seguido de la activación de la cascada de caspasas, llevando a la morfología apoptótica del citosol (Almeida, 2004; Buytaert et al. 2007). Además, la TFD también puede activar la vía extrínseca. Luego del estímulo fotodinámico se produce un incremento transitorio de los receptores FasR y de sus ligandos FasL. La unión del ligando al receptor produce su multimerización e interacción con el adaptador FADD. Fas-FADD clivan caspasa-8. Además se ha

reportado que el oxígeno singlete induce la multimerización y activación de los receptores Fas, de una manera independiente de los ligandos FasL (Almeida, 2004).

La TFD además puede provocar fotodaño en otras organelas e inducir igualmente apoptosis, por ejemplo, muchos FS se localizan en lisosomas; la ruptura de lisosomas luego de la fototerapia, provoca la liberación de proteasas al citosol las cuales pueden clivar Bid seguido de la activación de caspasas. La activación de caspasas en células tratadas con TFD, lleva al clivaje de numerosas proteínas celulares con diferentes funciones, entre las cuales podemos nombrar Bap-31, DNA-PKcs, ICAD, FAK, PARP y Ras-GAP (Ichinose et al. 2006)(Mroz et al. 2011).

Por otro lado, algunos FS se localizan en el aparato de Golgi, en este caso se ha observado una muerte celular dependiente de calcio e independiente de caspasas-3 (Ogata et al. 2003).

2.6.3 Inducción de necrosis por TFD

La necrosis esta morfológicamente caracterizada por la vacuolización del citoplasma, hinchazón y ruptura de la membrana celular, resultando en una respuesta inflamatoria causada por la liberación del contenido celular y moléculas pro-inflamatorias (Lodish et al. 2000)(Alberts et al. 2002). La necrosis es el resultado final de una “catástrofe bioenergética”, que resulta en la disminución de los niveles de ATP incompatibles con la supervivencia celular. Si bien la necrosis se ha definido como una vía de muerte pasiva, evidencias recientes indican que podría estar regulada, por lo menos en parte, por una vía de transducción de señales. En este sentido, los receptores TNF y Fas podrían estar involucrados en la necrosis a través de la activación de RIP-1 bajo condiciones de inhibición de caspasas. Además, se ha sugerido a RIP-1 como un elemento clave en la cascada de necrosis mediada por JNK, activada por PARP-1, estimulada por estrés oxidativo (B. Wei et al. 2014).

La TFD puede inducir necrosis. Altas dosis de TFD generan una inducción masiva de EROs llevando a una inmediata catástrofe bioenergética, una drástica disminución de los niveles de ATP e inhibición metabólica general. La necrosis, además es la principal vía de muerte inducida por TFD con FS localizados en membrana plasmática, los cuales provocan la pérdida de la integridad de la membrana, incapacidad de mantener el flujo

de iones a través de la membrana y disminución de los niveles de ATP. En ciertos casos se ha observado que la necrosis es la principal vía de muerte luego de protocolos de terapia fotodinámica, incluso con FS de localización intracitoplasmática y no en la membrana, lo que sugiere la existencia de vías de señalización que controlan la necrosis, incluso cuando la maquinaria apoptótica está intacta (Buytaert et al. 2007).

2.6.4 Inducción de autofagia por TFD

La autofagia es una vía lisosomal, conservada evolutivamente, que permite a las células eucariotas sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes (Kelekar 2005)(Levine 2005)(Mizushima & Klionsky 2007). Este proceso catabólico juega un rol protector contra la muerte celular, infección por patógenos, enfermedades neurodegenerativas y tumorigénesis (Nowak et al. 2009).

Las EROs producidas por la TFD pueden reaccionar con prácticamente todas las macromoléculas incluyendo lípidos, proteínas y ADN. Estas especies reactivas del oxígeno son una fuente de citotoxicidad y están reducidas por agentes y enzimas detoxificantes y antioxidantes. Esta primera línea de defensa es rápidamente superada durante la TFD, llevando al progresivo daño de la maquinaria celular. En células de mamíferos, la autofagia representan un importante sistema de limpieza de organelas dañadas por EROs y proteínas citosólicas oxidadas irreversiblemente las cuales tienen tendencia a formar agregados (Reiners et al. 2010).

Distintas evidencias indican que las EROs pueden activar la vía autofágica con consecuencias que van desde la citoprotección hasta la muerte celular autofágica (Scherz-Shouval, Shvets, Fass, et al. 2007). En este sentido la autofagia puede ser responsable de la resistencia a TFD como mecanismo de supervivencia a los efectos de las EROs. Sin embargo, muy poco se conoce acerca del mecanismo molecular subyacente a la activación de la autofagia a través de estas especies reactivas del oxígeno (Dewaele et al. 2011a).

Una variedad de líneas celulares activan el proceso autofágico en respuesta a la terapia fotodinámica, el efecto de pro-muerte o pro-supervivencia de esta vía depende de la línea celular y del estado de la maquinaria apoptótica. Se ha observado que en líneas deficientes en proteínas pro-apoptóticas como Bax y pro-caspasa 3 el estímulo

fotodinámico provoca claramente la activación de autofagia como vía de muerte celular, que se evidencia por la presencia de autofagosomas en citoplasma y excesiva acumulación de la proteína LC-3 clivada (LC-3 II). En este caso podemos pensar en muerte celular autofágica o muerte celular relacionada a la autofagia. Contrariamente, muchos reportes han demostrado que luego de la aplicación de TFD, la activación de la autofagia confiere resistencia a la muerte celular y la combinación de TFD con inhibidores autofágicos así como el silenciamiento de genes ATG (autophagic related genes) claves, aumenta la eficiencia del tratamiento (Dewaele et al. 2011a)(M.-F. Wei et al. 2014). Esto concuerda datos reportados por otros investigadores que demuestran que la activación constitutiva de genes autofágicos como *beclina 1* no provoca muerte celular, además, la activación de la vía autofagia en células que se desprenden de la matriz extracelular promueve la supervivencia, y la inhibición de genes autofágicos acelera la muerte de células epiteliales durante la formación del lumen en un modelo 3D de cultivo de epitelio glandular (Fung et al. 2008).

Esto sugiere que el rol de la autofagia en con contexto de la TFD es complejo y puede depender de una serie de factores como el tipo celular, la capacidad de inducir apoptosis y el protocolo de TFD empleado. En líneas generales, se considera que en células apoptosis competentes, la autofagia tiene un rol fundamental como mecanismo de supervivencia, por el contrario, en células incompetentes para realizar apoptosis, la activación de la autofagia podría resultar en la muerte celular (Reiners et al. 2010).

2.7 Fotosensibilizadores

Los fotosensibilizadores son compuestos capaces de absorber luz de onda específica y transformarla en energía útil. En el caso de la TFD, esta energía involucra la producción de agentes citotóxicos (Sharman et al. 1999).

Los compuestos que serán utilizados como FS deben reunir una serie de características para su utilización en terapia fotodinámica:

- Ser químicamente puro o de composición constante y conocida.
- Toxicidad mínima en oscuridad y solo citotóxico en presencia de luz.
- Ser preferentemente retenido en tejido blanco.
- Ser rápidamente excretado por el cuerpo.

- Ser fotoquímicamente reactivo con estado triplete y tener larga sobrevivencia. Capacidad de producir oxígeno singlete y otras especies de O_2 reactivo.
- Tener gran absorbancia con un alto coeficiente de extinción en una longitud de onda determinada (Foote 1991).

Photofrin, un fotosensibilizador de primera generación, fue aprobado para uso en tratamiento de tumores gástricos, de esófago, pulmón y vejiga con TFD (Dougherty 1993). La administración sistémica de esta sustancia, produce una fotosensibilización cutánea durante varias semanas, lo que constituye uno de los principales inconvenientes del tratamiento. Además la débil absorción relativa a 630 nm (longitud de onda empleada en el tratamiento), no permite una utilización óptima de la luz para este tratamiento (Allison et al. 2004).

Por esta razón, se ha iniciado la búsqueda de nuevos y mejores FS para ser empleados en los ensayos clínicos. Los nuevos FS de segunda generación incluyen las porfirinas, clorinas, ftalocianinas y naftalocianinas. Estos se han estudiado en profundidad y se están aplicando actualmente en ensayos clínicos. Dentro de estas nuevas drogas de aplicación en TFD se encuentra el ácido-5-aminolevulínico (ALA) y sus derivados (éteres hidrocarbonados), entre los que se encuentra el derivado metilado (Me-ALA). Los nuevos compuestos derivados del ALA permiten una mayor optimización de la TFD (Sharman et al. 1999).

2.7.1 Ácido delta 5-aminolevulínico

Kennedy y col. establecieron los protocolos actuales de TFD tópica utilizando un precursor de la protoporfirina IX (FS), el ácido delta 5-aminolevulínico (ALA) como profármaco, que

a diferencia de las grandes moléculas de porfirinas incapaces de penetrar la piel, es capaz de atravesar fácilmente la capa córnea (Kennedy et al. 1996).

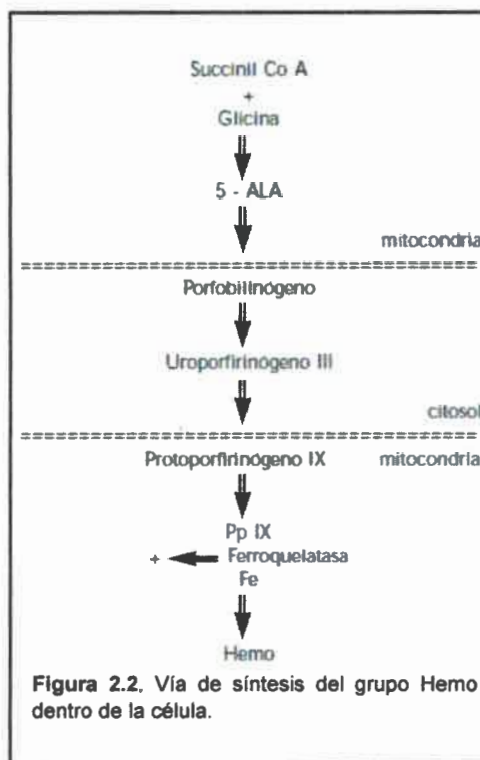


Figura 2.2. Vía de síntesis del grupo Hemo dentro de la célula.

La molécula de ALA puede ser sintetizada naturalmente en las células a partir de la glicina y el succinil coenzima A en el interior de la mitocondria. La formación del ALA es el primer paso de la biosíntesis del grupo hemo. Al final de dicha vía se encuentra la protoporfirina IX (Pp IX), a la cual se le incorpora el hierro gracias a la enzima ferroquelatasa (Kennedy et al. 1996)(Escudero et al. 2001) (**Figura 2.2**).

La administración exógena de ALA, estimula la vía de síntesis del grupo hemo de la célula, produciendo una acumulación endógena de protoporfirinas especialmente Pp IX. Este acúmulo intramitocondrial de Pp IX es debido a la capacidad limitada de la ferroquelatasa, y a que se consigue sobrepasar el mecanismo de retroalimentación negativa que produce la concentración del grupo hemo sobre la síntesis de ALA. El fenómeno de sobreproducción de Pp IX luego de la administración de ALA, se manifiesta en mayor medida en las células tumorales que en los tejidos sanos circundantes, lo que supone cierta selectividad por los tejidos neoplásicos. Al irradiar los tejidos cargados con Pp IX con una luz de espectro de absorción entre 585-720 nm en presencia de oxígeno molecular, se produce la liberación de EROs que llevan finalmente a la muerte de las células tumorales (Escudero et al. 2001). Además, ALA y sus derivados pueden ser aplicados para el fotodiagnóstico de tumores (mediante fluorescencia), los cuales pasarían inadvertidos por las técnicas convencionales si son de tamaño pequeño (Stummer et al. 2014).

En este trabajo se ha empleado como precursor del FS PpIX a un derivado de ALA: metil-ácido delta 5-aminolevulínico.

2.7.2 Metil-ácido delta 5-aminolevulínico

A causa de su baja lipofilidad, ALA difunde lentamente a través de las membranas celulares (Gaulhier et al. 1997). Por lo tanto, una gran cantidad de ALA debe ser aplicada en la piel para asegurar una acumulación adecuada en el tejido a tratar. Con el objetivo de aumentar su tasa de difusión, se han desarrollado derivados del ALA que poseen mayor lipofilidad, por ejemplo los derivados ALA-Met (Metil-ALA) y ALA-Hex (hexil-ALA). La prodroga derivada del ALA entra más rápidamente a las células y es hidrolizada enzimáticamente a ALA, induciendo a la formación y acumulación de Pp IX (Vena et al. 2004)(Fotinos et al. 2006).

El derivado metilado de ALA formulado en crema, Metvix, tiene como principio activo al metiléster del ácido aminolevulínico. Está autorizado y es comercializado en Europa, Australia, Nueva Zelanda y Brasil para el tratamiento de carcinoma basocelular nodular y superficial, de queratosis actínicas pequeñas y no pigmentadas y de la enfermedad de Bowen (un carcinoma de células escamosas in situ) (Szeimies et al. 2002).

2.8 Aplicación de la TFD en cáncer de colon

El desarrollo del láser en 1960 significó la fácil transmisión de luz a través de fibras ópticas flexibles e hizo posible la TFD endoscópica, de esta forma, tanto broncoscopistas como gastroenterólogos se interesaron en tratar tumores con esta terapia (Hayata 1982).

El interés inicial de aplicar TFD en cáncer estuvo basado en la acumulación selectiva de FS en el tejido tumoral con respecto a tejido normal aumentando la posibilidad de destrucción selectiva del tumor. En 1968 Gregory et al. demostraron que 5 adenocarcinomas rectales (y muchos otros tejidos tumorales) retenían selectivamente Hematoporfirina y podían ser fácilmente identificados por la fluorescencia emitida luego de la irradiación con luz de longitud de onda determinada (Gregorie et al. 1968). Otros investigadores utilizaron esta técnica para identificar tejido neoplásico mediante endoscopia en pacientes con colitis ulcerosa (Agrev MV, 1983).

La TFD como tratamiento antitumoral en cáncer de colon ha sido aplicada como terapia adyuvante intraoperatoria. Barr H. y colaboradores han aplicado TFD endoscópica en pacientes con CCR utilizando el FS hematoporfirina, concluyendo que la TFD puede utilizarse como tratamiento en lesiones pequeñas o pequeñas áreas de persistencia del tumor (Barr et al. 1990)(Barr et al. 1991).

Actualmente se considera que la aplicación de TFD en cáncer de colon tiene un efecto citotóxico moderado. Si bien el tratamiento parece ser eficiente en tumores de estadios tempranos, los tumores avanzados presentan resistencia a la terapia. Esto puede deberse en parte, a la limitada profundidad de penetración de la luz en tumores de mayor tamaño (Stukavec et al. 2009), sin embargo, también se ha vinculado la resistencia de tumores avanzados a la TFD a la presencia de regiones hipóxicas, típicas de tumores sólidos, y

previamente asociadas también a la resistencia a quimio/radioterapia (Milla Sanabria et al. 2013).

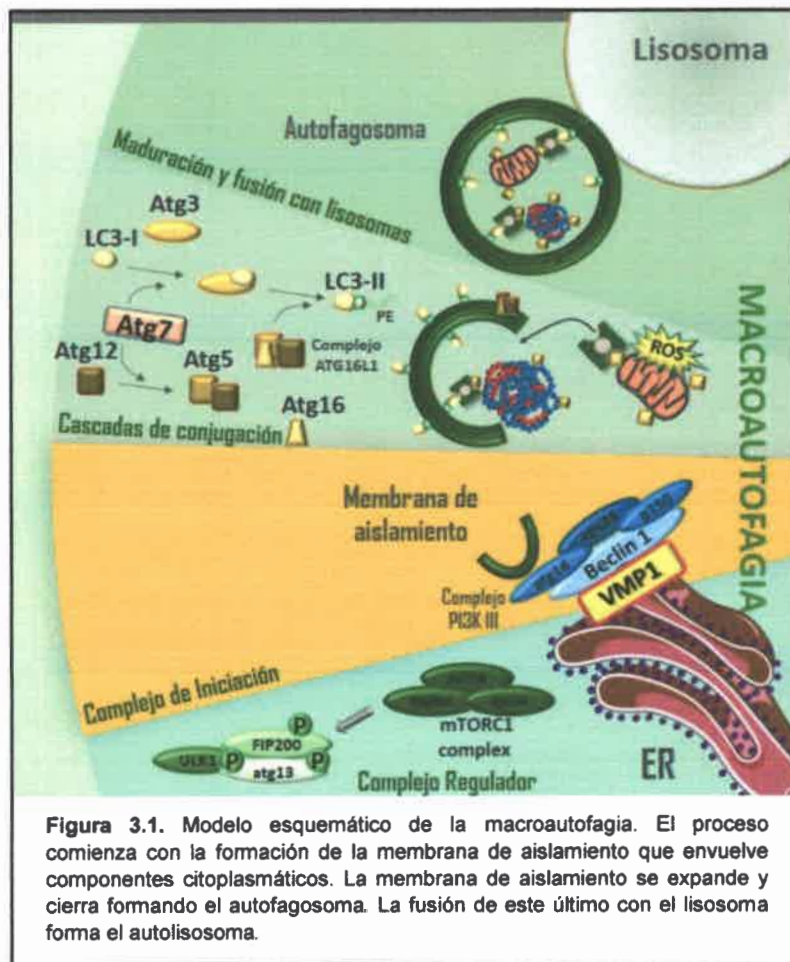
Esto pone en evidencia la necesidad de realizar estudios más profundos sobre el impacto de las regiones hipóxicas sobre el fenómeno de resistencia a la TFD en cáncer de colon, así como estudiar y determinar los mecanismos moleculares implicados con el objeto de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que aumenten la eficiencia de la TFD.

En este trabajo, se propone utilizar como FS el 3-Metil-ALA (ALA-Met) en las líneas de carcinoma de colon CaCo2 y SW480.

CAPITULO 3

3. AUTOFAGIA

La autofagia se define como un proceso de supervivencia celular programada que consiste en la degradación de componentes celulares en estructuras de doble membranas llamadas autofagosomas, estos últimos experimentan un proceso de maduración que culmina con la fusión a lisosomas para formar autolisosomas donde los componentes citoplasmáticos son degradados y reciclados para proveer elementos esenciales tales como aminoácidos (Kang et al. 2011) .



La autofagia ocurre a nivel basal en la mayoría de los tejidos, contribuye al recambio rutinario de los componentes citoplasmáticos y tiene un rol crítico en la diferenciación, desarrollo y remodelación de tejidos (Levine & Klionsky 2004). Existen tres tipos de autofagia llamadas microautofagia, autofagia mediada por chaperonas y macroautofagia

(Klionsky 2004). La macroautofagia tiene un papel fisiológico importante en la salud humana y su desregulación está implicada en enfermedades como cáncer, enfermedades infecciosas, obesidad, envejecimiento y desordenes neurodegenerativos (Huang & Klionsky 2007). En este apartado haremos referencia a este último proceso y lo llamaremos autofagia.

El proceso de autofagia está muy bien comprendido en levaduras, pero en mamíferos, los detalles de la maquinaria molecular que lo regula siguen siendo el foco de muchos estudios. Durante el inicio de la autofagia se forma una membrana en forma de copa, o membrana de aislamiento, que envuelve componentes citoplasmáticos. La formación de esta membrana está regulada por un complejo formado por PI3K (clase) III, PIK3R4, UVRAG y AMBRA. Por otro lado, la proteína citosólica LC3-I sufre un proceso de proteólisis y lipidación, convirtiéndose en LC-3II y translocándose desde el citosol a la membrana de aislamiento, anclándose vía una fosfatidiletanolamina (PE) (Kabeya et al. 2000). Esta membrana se fusiona completamente encerrando el contenido citoplasmático en una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma (Mizushima et al. 2002)(Wang & Klionsky 2003.). Aún no está claro el origen de la membrana de autofagosoma, aunque se sugiere al retículo endoplasmático como principal fuente de la misma (Ktistakis et al. 2011) (**Figura 3.1**).

Luego la membrana externa del autofagosoma se fusiona con el lisosoma, la membrana interna del autofagosoma, junto con todo el contenido citoplasmático son degradados por las enzimas lisosomales y la moléculas resultantes son recicladas. La fusión del autofagosoma con el lisosoma da lugar al autolisosoma.

Previo a la formación del autolisosoma, el autofagosoma sufre un proceso de maduración que consiste en la fusión previa al lisosoma con cuerpos multivesiculares y endosomas tempranos o tardíos (Punnonen et al. 1992).

3.1 Autofagia, Muerte celular y Cáncer

El papel de la autofagia en la muerte celular es controversial. A pesar del acuerdo de que la autofagia es una respuesta adaptativa, no hay acuerdo respecto a que la autofagia descontrolada puede eliminar los orgánulos y las proteínas críticas hasta el punto de la muerte celular independiente de caspasas sin signos de apoptosis. Aunque hay

incremento numérico en los autofagosomas en algunas células que mueren, no está claro si estas estructuras facilitan la muerte celular que no puede compensarse más y sacrifican sus componentes vitales, un proceso que se refiere como muerte celular asociada a la autofagia más que muerte celular autofágica. La delección de genes autofágicos claves acelera más que inhibe la muerte celular, lo que enfatiza el papel de supervivencia predominante de la autofagia. Por otro lado, algunos autores han observado que la activación constitutiva de genes autofágicos como Beclina-1 no induce muerte celular (Maiuri et al. 2009).

La autofagia tiene un papel complejo (y dual) en el cáncer. Aunque los datos actuales son solamente asociativos, la autofagia presumiblemente funciona como un supresor de la neoplasia. Muchos oncogenes (incluye a los miembros de la familia de P13K y AKT, BCL2, y MTOR) suprimen la autofagia, mientras los supresores de tumores tales como PTEN, TSC2, y HIF1 α la promueven (Maiuri et al. 2009). Por otro lado, la pérdida de los genes relacionados con la autofagia (especialmente BECN1, UVRAG y BIF [ZBTB24]) resultan en linfomas y tumores gastrointestinales en modelos animales, y estos mismos genes están frecuentemente mutados en cánceres humanos, incluyendo los carcinomas del intestino y los hepatocelulares (Gozuacik & Kimchi 2004)(Brech et al. 2009) (Kung et al. 2011).

En contraposición, en tumores establecidos, la autofagia tiene un rol pro-tumoral, y es necesaria para la supervivencia de las células bajo condiciones de estrés nutricional propias del microambiente tumoral hipóxico (Chen & Karantza-Wadsworth 2009)(Hu et al. 2012)(Milla Sanabria et al. 2013). Además, algunos autores han demostrado una relación entre niveles aumentados de autofagia tumoral y mayor capacidad metastásica (Xu et al. 2013)(Peng et al. 2013)(David 2014) sugiriendo que esta vía puede estar implicada en la supervivencia y progresión de la enfermedad. Por otro lado, y en acuerdo con el rol protector de la vía autofágica, se ha reportado que en pacientes sometidos a quimioterapia, la autofagia puede promover resistencia a la muerte celular, especialmente a los agentes que dañan el ADN (Yang et al. 2011).

En la actualidad, se considera que la autofagia es un mecanismo que promueve la homeostasis celular y supervivencia. En células normales, la autofagia tiene un importante rol en el mantenimiento del equilibrio interno y eliminación de componentes (ej. Organelas) dañados que pueden provocar entre otras cosas, desestabilidad genómica y

promover tumorigénesis, actuando de esta manera como un supresor tumoral. Sin embargo, en células tumorales establecidas, la promoción de la supervivencia celular (durante el desarrollo tumoral o en respuesta a daños inducidos por tratamientos) sugiere un rol pro-tumoral del mecanismo autofágico (White 2012).

La escasez de nutrientes es una de las primeras barreras que deben vencer las células tumorales durante la progresión del cáncer. Frente a esta situación las células activan mecanismos que le permiten sobrevivir en esta situación de estrés, tal como la vía autofágica. Además, deben estimular el crecimiento de vasos sanguíneos en sus cercanías lo cual será responsable de la nutrición adecuada del tumor en crecimiento, dicho proceso se conoce como angiogénesis e involucra la liberación por parte de las células tumorales y/o circundantes al tumor de “factores angiogénicos” como son VEGF, BFCF y TGF-alpha (Maiuri et al. 2009).

Por otro lado, la autofagia ha sido también relacionada con la resistencia a anoikis, una forma de muerte celular programada inducida por la pérdida o inapropiada adhesión celular (Valentijn et al. 2004): Se ha observado en modelos de cultivos tridimensionales, que la activación de la vía autofagia en células que se desprenden de la matriz extracelular tiene un rol protector contra la muerte celular (Reiners et al. 2010).

Estos datos sugieren que la autofagia es un mecanismo importante en el desarrollo del cáncer y pone a luz la necesidad de realizar estudios más profundos acerca del rol de este proceso tanto en el inicio como en la progresión y transformación maligna de las células tumorales. Además es necesario buscar nuevos blancos terapéuticos que nos permitan modular esta vía de supervivencia y aumentar la eficiencia de las terapias anticancerígenas actuales.

3.2 Regulación del proceso autofágico

El proceso autofágico puede ser subdividido en diferentes etapas: iniciación, nucleación, expansión, maduración y fusión (del autofagosoma con el lisosoma). La iniciación es la transmisión de la señal (de inicio del proceso autofágico) hacia la membrana “fuente” en la cual ocurrirá la nucleación de la membrana de aislamiento y en donde ocurre el reclutamiento del complejo de iniciación. La nucleación resulta en la formación de la membrana de aislamiento desde la “membrana fuente” (Ej. Retículo

Endoplásmico). La expansión de la membrana de aislamiento ocurre hasta que el autofagosoma se forme y cierre completamente (Lamb et al. 2013) (**Figura 3.1**).

3.2.1 **Iniciación: El complejo mTOR/ULK y PI3KIII**

La escasez de nutrientes induce fuertemente la activación de la autofagia. Las células pueden censar los niveles de aminoácidos en el medio, se ha reportado que existen vías de señalización que involucran la activación de la proteína mTOR (serine/theonine kinase mammalian target of rapamycin) y subsecuente regulación de la PI3K clase III (Nobukuni et al. 2005)

El complejo mTORC1 requiere de las proteínas Rag GTPasa, Rheb y Vps34 para su activación e inhibición de la autofagia (Sancak et al. 2010).

Por otro lado, la proteína AMPK es el principal censor de energía. A niveles bajos de ATP, AMPK es activada e inhibe al complejo mTORC1 fosforilando a TSC1/TSC2 y Rheb (Gwinn et al. 2008). Además, AMPK puede inducir autofagia fosforilando y activando ULK1 (Kim et al. 2011).

La inhibición de mTORC1 es crucial para la inducción de la autofagia. Otros factores como Bcl-2 (Levine et al. 2008), EROs (Li et al. 2013)(Scherz-Shouval, Shvets, Fass, et al. 2007), calcio (Green & Wang 2010), y la expresión de la proteína BNIP3 (Tracy & Macleod 2010) pueden modular la activación de la autofagia, aunque no necesariamente de forma dependiente de mTOR.

En células de mamíferos el inicio de la formación del autofagosoma está regulado por el complejo ULK que consiste en las proteínas ULK1 (y ULK2 con función redundante), ATG13, FIP200 y ATG101 (Ganley et al. 2009)

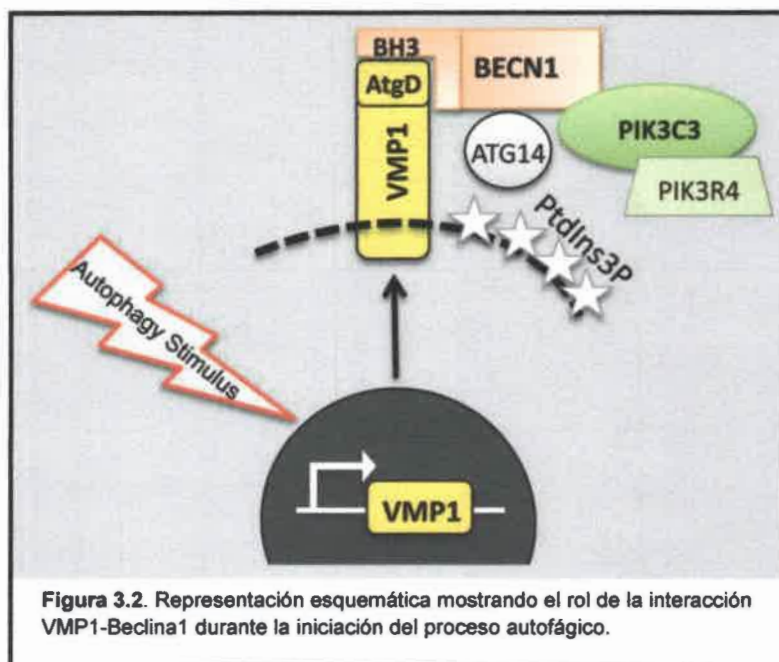
La actividad del complejo ULK1 está mediada por mTOR y depende de la concentración de nutrientes. En condiciones normales mTORC1 interactúa con el complejo ULK y fosforila ULK1 y ATG13 inhibiendo la capacidad del complejo a dirigirse a la membrana. Durante la escases de nutrientes u otras condiciones de estrés, mTORC1 se disocia del complejo ULK1/ULK2 lo cual resulta en la incrementación de su actividad quinasa permitiéndole inducir la autofagia (Hara et al. 2008) (Lamb et al. 2013). El dominio C-terminal de ULK1/ULK2 se une a la membrana fuente y permite el reclutamiento del complejo al sitio de iniciación del autofagosoma (Chan et al. 2009).

Igualmente importante durante la iniciación del autofagosoma es la formación del complejo PI3KIII.

En mamíferos el complejo PI3KIII juega un papel esencial durante la iniciación y nucleación de la membrana de aislamiento (Mariño & López-Otín 2004). La PI3KIII (vps34) se asocia con Beclina-1 y p150 para formar el complejo PI3KIII. En este primer paso es necesario el reclutamiento de la proteína Beclina-1. Si bien el rol molecular de Beclina-1 no están bien comprendido se sabe que se asocia con el complejo PI3KIII y promueve la actividad catalítica de vps34 para generar PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate)(Funderburk et al. 2010).

La interacción de Beclina-1 con vps34 recluta diferentes componentes esenciales para la formación del autofagosoma, dependiendo de qué proteínas reclute Beclina-1, el complejo PI3KIII regula diferencialmente el proceso de formación de la vesícula (Proikas-Cezanne & Codogno 2011).

Se han encontrado otras proteínas que forman parte del complejo PI3KIII tales como AVRAG, ATG14, AMBRA, Bif, (Itakura et al. 2008)(Funderburk et al. 2010)(Takahashi et al. 2007)



Recientemente se ha demostrado que la proteína VMP1 tiene un importante rol en la formación del autofagosoma (Molejon et al. 2013).

VMP1 es la única proteína ATG que no tiene ortólogos en levaduras o eucariotas inferiores y cuya expresión es capaz de inducir autofagia en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Ropolo et al. 2007)(Grasso et al. 2011). Por el contrario, el bloqueo de VMP1 bloquea la autofagia (Ropolo et al. 2007).

VMP1 se localiza en ER (Dusetti et al. 2002) y actúa como una plataforma promoviendo la organización de la maquinaria que regula la formación del autofagosoma, en este sentido, la interacción VMP1-Bclina-1 libera beclina-1 de su asociación inhibitoria con Bcl-2 y promueve la formación y actividad del complejo VMP1-Bclina-1-Vps34 (complejo PI3KIII) induciendo la formación de PIP3 y la subsecuente asociación de ATG16L1 a la membrana autofagosomal (Molejon et al. 2013) (**Figura 3.2**).

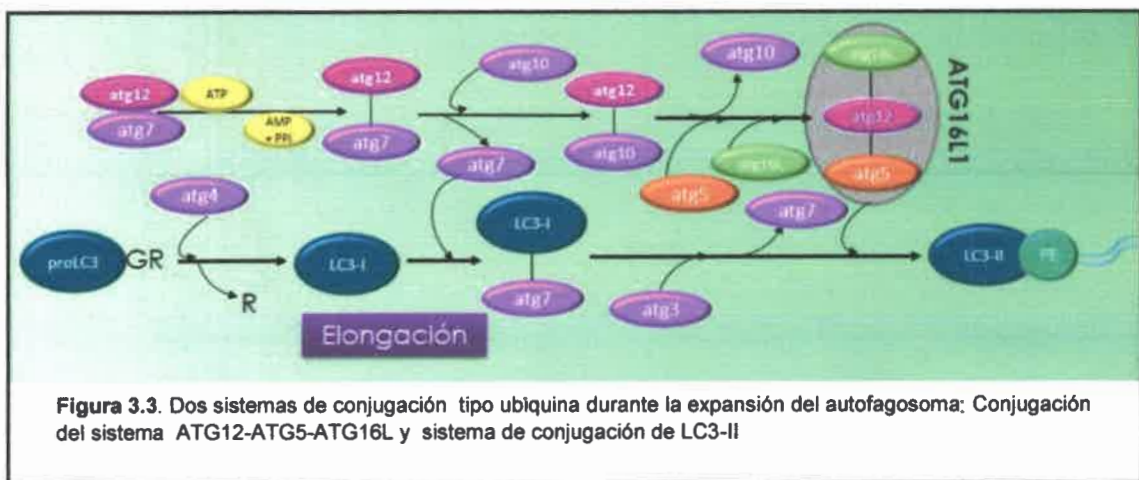
3.1.2 Nucleación

Una vez activado y marcado el sitio de inicio de formación del autofagosoma, el complejo ULK puede fosforilar al complejo PI3KIII y promover la actividad catalítica de Vps34, proceso que culmina en la formación de un “pool específico de autofagosoma” de PIP3. Estos eventos conducen a la nucleación de la membrana de aislamiento y el reclutamiento de proteínas ATG adicionales y efectores específicos de PIP3 tales como las proteínas DFCP1 y WIPI (Simonsen & Tooze 2009) necesarios para la expansión y cierre de los autofagosomas. Aunque el rol de PIP3 durante la formación de la membrana de aislamiento es desconocida, el bloqueo de la generación del pool de PIP3 autofágico, inhibe autofagia (Klionsky 2005)(Taguchi-Atarashi et al. 2010).

3.1.3 Expansión: Sistemas de conjugación de proteínas tipo ubiquitina

Luego de la nucleación, el complejo ATG16L1 es reclutado hacia la membrana de aislamiento donde funcionará como una ligasa E3 mediando la lipidación de LC3, GATE16 y GABARAP, confiriendo a estas proteínas la capacidad de anclarse en la membrana del autofagosoma en formación (Mizushima et al. 2011).

El sistema de conjugación ATG16L1 está formado por ATG12-ATG5-ATG16L. Durante la formación de este complejo, ATG12 está conjugada con ATG5 (Kuma et al. 2002). ATG5 es activada por ATG7 (E1) y transferida a ATG10 (E2) y finalmente anclada a la lisina 159 de ATG12. Luego el complejo ATG12-ATG5 interactúa con ATG16L para formar el complejo ATG12-ATG5-ATG16L (Mizushima et al. 2002). El segundo sistema de conjugación es la modificación de la proteína LC3-I por el fosfolípido fosfatidiletanolamina (PE) (Tanida et al. 2002). LC3-I es clivada por la proteína ATG4 y luego conjugada a PE por ATG7 y ATG3 (Figura 3.3).



La LC3-II (clivada y unida a PE) se asocia con los autofagosomas en formación y se ha sugerido que cumple un rol importante direccionando la expansión y cerrado de la membrana de aislamiento (dando como resultado el autofagosoma)(Fujita et al. 2008)(Weidberg et al. 2011) y su retención en el interior del autofagosoma ha sido ampliamente utilizado como marcador de vesículas autofágicas (a través de la expresión de la proteína de fusión LC3-GFP o LC3-RFP) (Burman & Ktistakis 2010). A diferencia de LC3, las proteínas ATG asociadas a la membrana de aislamiento, se disocian de la misma una vez que la formación del autofagosoma se completa (Lamb et al. 2013).

3.1.4 Formación del autolisosoma

Previo a la fusión con el lisosoma, los autofagosomas maduran por la fusión con vesículas derivadas de endosomas. Estas estructuras ahora llamadas anfisomas poseen

marcadores endocíticos pero pocas proteínas lisosomales. Si bien no se conoce la función de la formación de anfisomas, su inhibición causa una acumulación masiva de autofagosomas, sugiriendo que la fusión con endosomas provee al autofagosoma de la maquinaria necesaria para la fusión con el lisosoma (Burman & Ktistakis 2010).

Luego de la fusión del autofagoma al lisosoma, las hidrolasas lisosomales degradan la membrana interna de la vesícula junto con el material citoplasmático. El mecanismo molecular de transporte y fusión de los autofagonomas no está del todo comprendido.

En levaduras, la fusión requiere de la maquinaria SNARE y proteínas tales como Vam3 (Hayashi-Nishino et al. 1997), Vam7 (Sato et al. 1998) y proteínas de la familia Rab GTP (Mayer & Wickner 1997). En mamíferos, las proteínas Rab22 y Rab24 son esenciales para la maduración del autofagosoma, así como la familia de las SNF (ortólogos de las SNARES). Recientemente se ha observado que UVRAG, Rubicon, VCP y Presilina-1 pueden ser reguladores del proceso de maduración (Mizushima et al. 2002).

Rab 7 y Rab11 también fueron identificadas como reguladores de la maduración de los autofagosomas (Savina et al. 2005). En este sentido, la maduración depende de la interacción de UVRAG con proteínas Vps clase III. La función de UVRAG depende su interacción con Beclina-1 y estimula la actividad GTPasa de Rab7 y la fusión del autofagosoma a endosomas y lisosomas (Liang et al. 2008)

Por otro lado, el complejo ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) juega un rol en la fusión del autofagosoma al lisosoma.

Las proteínas Vt1 y Vt1b (homologos de las t-SNARES Vam3 y Vt1 de levaduras) han sido involucradas en los estadios tardíos de la autofagia. Además VAMP3 y VAMP7, dos v-SNARES, controlan la fusión de los autofagosomas a cuerpos multivesiculares y la fusión de los anfisomas a los lisosomas, respectivamente (Fader et al. 2009)

La familia de proteínas asociadas a membrana lisosomal (LAMP), están implicadas en la formación de los autolisosomas, se ha observado un bloqueo de la autofagia en un estadio tardío en células deficientes de LAMP-2. Sin embargo el efecto de la inhibición de LAMPs parece depender el tipo celular, y el tipo de LAMPs que expresen (Eskelinen et al. 2005).

El último paso de la autofagia es el eflujo de los metabolitos generados por la degradación lisosomal, hacia el citosol (Lloyd, 1996). Recientemente se ha identificado

a la proteína ATG22, en levaduras, como la permeasa que recicla los aminoácidos desde la vesícula (Yang et al. 2006)(Tong et al. 2010).

3.2 Regulación del proceso autofágico: El Factor Inducible por Hipoxia (HIF-1)

Si bien se han caracterizado que en la mayoría de los casos, las señales inductoras de autofagia están mediadas por el complejo mTOR, se han reportados diferentes mecanismos de inducción en los que no necesariamente interviene la vía mTOR/ULK.

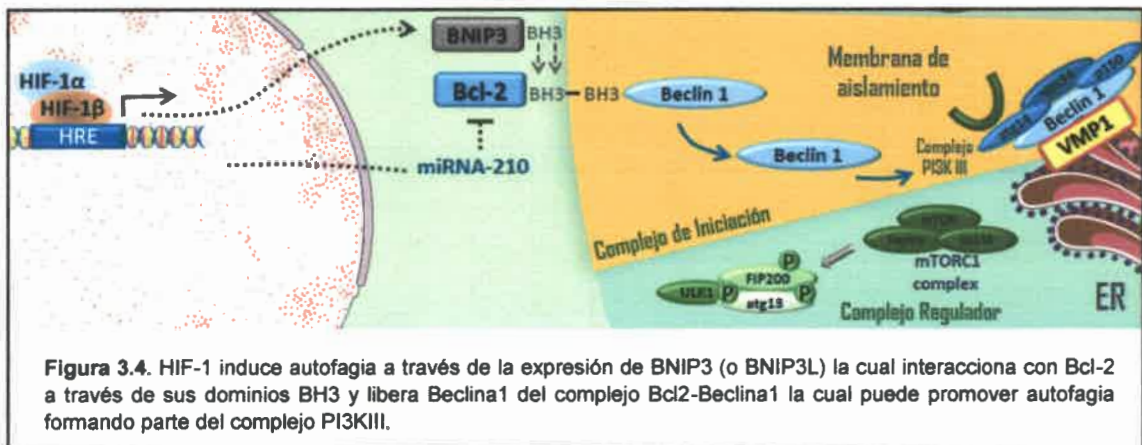
En este contexto, existen diversos factores de transcripción que han sido vinculados con la modulación de la autofagia (Maryam Mehrpour; Joëlle Botti; Patrice Codogno 2011) tales como el NF-kb quien puede inducir la expresión de Beclina-1 a través de la unión a su promotor (Copetti et al. 2009). Otros factores, como E2F1, FOX, y p53 son capaces de inducir la activación de la vía autofágica (Maryam Mehrpour; Joëlle Botti; Patrice Codogno 2011). Por otro lado, el estímulo hipóxico ha sido reportado como un potente inductor del proceso autofágico independiente de mTOR (Bellot et al. 2009) y comandado principalmente por el factor de transcripción HIF-1 (principal modulador de la transcripción de cientos de genes de respuesta a hipoxia) (Manalo et al. 2005). Bajo condiciones de hipoxia se previene la degradación proteosomal de HIF-1 alpha por inhibición de prolihidroxilasas (PHD), llevando a su estabilización y translocación nuclear donde se dimeriza y activa la expresión del factor de crecimiento de endotelio vascular, transportador de glucosa y otros genes blancos que son necesarios para la supervivencia de las células (Marxsen et al. 2004).

Las áreas hipóxicas son características comunes de los tumores de crecimiento rápido así como sus metástasis. El tejido hipóxico tiene una limitada vasculatura. Se piensa que la condición de hipoxia es un evento temprano en la biología tumoral, y comienza cuando este alcanza apenas unos pocos milímetros de diámetro (Folkman 1990). Incluso luego de la neovascularización, la demanda de oxígeno del tumor es superior a la aportada por su vasculatura, y la hipoxia sigue siendo una característica en los estadios posteriores (Harris 2002). A bajos niveles de oxígeno se expresan genes involucrados en el metabolismo celular, proliferación celular, supervivencia y angiogénesis, todos ellos promueven la adaptación celular a la condición de hipoxia (Semenza 2001). Recientemente se ha propuesto a la autofagia como una importante vía

de supervivencia modulada por HIF-1 en condiciones de hipoxia. HIF-1 induce autofagia (mitocondrial) mediante la inducción de la expresión de las proteínas BNIP3 y BNIP3L (NIX) (Zhang et al. 2008) las cuales liberan a Beclina-1 de su interacción con Bcl-2, permitiendo su participación en la formación del complejo PI3KIII (Bellot et al. 2009) (Figura 3.4)

Además, tanto BNIP3 como BNIP3L contienen dominios de interacción con LC3 (Novak et al. 2010) lo que les permite actuar como receptores de carga para mitocondrias durante la mitofagia (degradación específica de mitocondrias por autofagia) (Ashrafi & Schwarz 2012).

Por otro lado, se ha observado que las señales hipóxicas pueden ser transmitidas a la maquinaria autofágica a través de la inducción de la vía AMPK y de forma independiente de HIF-1/BNIP3/BNP3L, aunque de forma dependiente de mTOR (Alers



et al. 2012).

Por último se ha sugerido que HIF-1 podría inducir la expresión de Beclina-1 aunque de una forma indirecta (Bohensky et al. 2007).

CAPÍTULO 4

4. RESISTENCIA A LA TFD: implicancias del microambiente tumoral

Prácticamente todos los agentes anticancerígenos usados en clínica entran en la célula por difusión pasiva. Por ello, cuanto mayor sea la concentración extracelular del fármaco, mayor será la cantidad que pasa al interior. Entre los factores que pueden alterar la concentración extracelular de un fármaco se encuentran la administración de una dosis insuficiente, la inactivación metabólica, la dificultad de acceder al tumor por una vascularización tumoral alterada o las barreras fisiológicas, como las existentes en el sistema nervioso central y los testículos (Lehnert et al. 1996).

Por mucho tiempo el cáncer fue considerado como una enfermedad que consiste en células transformadas que adquieren la capacidad de hiperproliferar descontroladamente e invadir tejidos vecinos. Por esta razón, los tratamientos antitumorales se han dirigido y limitado a las células propias de tumor. Evidencias recientes indican que para diseñar terapias más eficientes es necesario considerar la carcinogénesis y la progresión tumoral como el resultado de una compleja y heterotípica interacción multicelular como en un tejido, el tejido tumoral (Bissell et al. 2002)(Pietras & Ostman 2010).

Se denomina microambiente tumoral al sistema de componentes bióticos (células) y abióticos coexistiendo e interactuando en lo que en conjunto llamamos tumor. Entre estos componentes se destacan las células tumorales que forman el parénquima y las células no tumorales como células endoteliales, células del sistema inmune y fibroblastos, todos constituyendo el estroma tumoral, cada una de ellas con un importante rol dentro del microentorno. Además, componentes no celulares forman parte del sistema, como la matriz extracelular que mantiene la arquitectura e integridad del tumor, así como regula diversas funciones bioquímicas. Se considera al microambiente tumoral como un entorno “desfavorable” en el cual la célula tumoral promueve su propia supervivencia a través de la adquisición de cualidades con las que tumor sobrevive y prolifera (Rumie Vittar et al. 2013). El estroma asociado al tumor, presenta una matriz extracelular alterada y un incremento en el número de fibroblastos que secretan factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión celular (Aznavorian et al. 1990). La MEC del tumor puede variar enormemente tanto en cantidad como en composición (Ohtani 1998). El estroma

tumoral puede influenciar la transformación maligna (Kinzler & Vogelstein 1998), jugar un rol importante en la invasión y metástasis (Bissell & Radisky 2001) y afectar la sensibilidad del tumor al tratamiento anticancerígeno (Trédan et al. 2007).

En un trabajo reciente se ha documentado el rol de los diferentes componentes del microambiente tumoral en la respuesta del tumor a la TFD (Rumie Vittar et al. 2013).

Además, un aspecto importante del microentorno es la estructura tridimensional de los tumores sólidos (Herman et al. 2011).

La resistencia de los tumores humanos a las terapias antitumorales es atribuida a mutaciones, amplificaciones genéticas, cambios epigenéticos que influyen en la captura (por parte del tumor), transporte y metabolismo de la droga. Muchos de estos cambios son regulados por la arquitectura de los tumores sólidos. La eficacia de las terapias depende, por lo menos en parte, de la capacidad de transporte de la droga a través de la vasculatura tumoral, escape de la droga de esta vasculatura e incursión en el tejido tumoral. Además la heterogeneidad presente en el microambiente tumoral crea un marcado gradiente en la velocidad de proliferación celular y en la generación de regiones hipóxicas y ácidas que tienen un fuerte impacto en la sensibilidad de las células al tratamiento anticancerígeno (Trédan et al. 2007).

Este mecanismo particular de resistencia se denomina “resistencia multicelular” (Burgués Gasión et al. 2005) y aparece en los cultivos de agregados celulares tridimensionales (esferoides) y no en las mismas células cultivadas en monocapa o en suspensiones celulares individuales (Iracheta 2007).

El estudio de agregados tridimensionales permite analizar variables como la permeabilidad de los agregados celulares a los fármacos (por ejemplo, la presencia de colágeno en el tejido intersticial tumoral, puede dificultar la penetración de las drogas) así como los gradientes de oxígeno, nutrientes y proliferación (Burgués Gasión et al. 2005)

Los tumores sólidos, son organizaciones “tipo-órganos” que presentan una estructura compleja y heterogénea. La mayoría de los tumores sólidos contienen regiones hipóxicas. La limitada vasculatura tumoral resulta en una limitada difusión de oxígeno (Tannock 1968)(Vaupel et al. 1989) . Las células que se encuentran en las regiones hipóxicas son viables. Si las células cercanas a los vasos sanguíneos son eliminadas luego del

tratamiento, los nutrientes son tomados por las células previamente hipóxicas, las cuales pueden mejorarse y regenerar el tumor (recidivas) (Trotter et al. 1989).

Las regiones hipóxicas de los tumores tienen una disminuida disponibilidad de nutrientes tales como glucosa y aminoácidos (Warburg. 1956)

La presencia de hipoxia en los tumores es conocida por conducir a la activación de genes asociados con la angiogénesis y supervivencia celular, y su efecto está mediado principalmente por el factor inducible por hipoxia-1 (HIF-1). La expresión de estos genes puede dar lugar a la expansión de poblaciones de células con vías metabólicas alteradas que pueden tener un fenotipo resistente (Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW 1996)(Kondo et al. 2001) promoviendo su propagación y adaptación a la deprivación nutricional escapando a su microambiente hostil.

HIF-1 promueve la transcripción de factores angiogénicos tales como VEGF y lleva a un incremento de la glucólisis por inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial (Papandreou et al. 2006)(Kim et al. 2006).

Bajo condiciones de normoxia, HIF-1a es hidroxilado por proteínas que contienen dominiosprolil-hidroxilasas (PHD) y así es marcado para la degradación en proteosoma (Salceda & Caro 1997). La hipoxia, así como los altos niveles de EROs inhiben la actividad PHD llevando a la estabilización de HIF-1a y su dimerización con HIF-1b en el núcleo, formando el dímero activo (HIF-1) (Schofield & Ratcliffe 2005)(Valko et al. 2006).

Tanto la hipoxia como el estrés oxidativo inducen autofagia (Lin & Kuang 2014)(Paggetti et al. 2014)(Fang et al. 2015). Este es un mecanismo, recientemente reconocido, de resistencia a quimioterapia y terapias dirigidas (Ma et al. 2011). La autofagia optimiza la utilización de nutrientes en células de rápido crecimiento que se encuentran en estrés hipóxico y metabólico y así contribuye a la supervivencia y crecimiento normal de las células tumorales (Jin & White 2008).

La respuesta autofágica, reciclando proteínas y componentes celulares puede contribuir a la progresión del tumor como un mecanismo protector contra condiciones microambientales estresantes (Ej. Estrés metabólico) incluyendo las terapias antitumorales (Amaravadi & Thompson 2007). Se ha sugerido que en condiciones de hipoxia, la preservación del “fitness” celular por autofagia puede ser crucial para la

progresión del tumor previniendo la muerte celular de la célula cancerosa (Liu et al. 2010).

El rol de la autofagia como mecanismo de supervivencia bajo estrés metabólico ha sido bien documentado por Mizushima y colaboradores (Mizushima 2007).

Estudios pioneros sobre el rol de la autofagia en tumores sólidos (in vivo) fueron realizados por Degenhard y colaboradores, quienes demostraron que en tumores con alteraciones en la maquinaria apoptótica, la vía autofágica confiere la capacidad de sobrevivir y sostener las funciones celulares normales frente a la privación de nutrientes. Como consecuencia, la inhibición de la autofagia promueve la muerte celular por necrosis (Degenhardt et al. 2006). En acuerdo con estos resultados, Mathew y colaboradores confirmaron la activación de la vía autofágica en las regiones con estrés metabólico en tumores de mama, además en tumores beclinal ^{+/−} (con una menor capacidad de activar autofagia), las regiones con estrés metabólico fueron asociadas con un incremento de la muerte celular. Por lo tanto, la autofagia puede ser crítica para la preservación de la sustentabilidad celular en el microambiente tumoral, sosteniendo (al menos temporalmente) las funciones celulares en condiciones de estrés nutricional, el cual es una de las características comunes de los tumores sólidos (Folkman 2003).

En conclusión, el microambiente tumoral juega un importante rol en el crecimiento del tumor, metástasis y respuesta a la terapia anticáncer.

En este trabajo nos focalizamos en los mecanismos de resistencia a la TFD mediadas por el microambiente tumoral y las implicancias de la autofagia activada por el factor HIF-1. Además, teniendo en cuenta que tanto la hipoxia como la autofagia han sido implicadas como vías inducidas por TFD con efecto citoprotectivo (Dewaele et al. 2011a), evaluaremos el rol de la autofagia inducida por la TFD y la posible regulación de este proceso por el factor HIF-1 luego del fototratamiento.

4.1 La TFD induce la expresión de HIF-1 y activación de autofagia

La exposición de un agente fotosensibilizador a luz de longitud de onda adecuada induce una reacción foto-física que resulta en la liberación de especies reactivas del oxígeno las cuales pueden inducir autofagia (Scherz-Shouval, Shvets, Fass, et al. 2007). La primera línea de defensa contra las EROs puede ser sobrepasada rápidamente durante

la TFD, (Nyström 2005). Si bien, el mecanismo molecular por el cual las EROs modulan la autofagia no está completamente claro, el tipo de EROs, grado de daño y los blancos moleculares involucrados pueden afectar la respuesta a la TFD. Los FS localizados en mitocondrias y retículo endoplasmáticos causan fotodaño en moléculas específicas como Bcl-2, Bcl-XL y mTOR, todas proteínas involucradas en el proceso autofágico (Reiners et al. 2010). La proteína Beclina-1 es capaz de unirse a Bcl-2 (Patingre et al. 2005). Bcl-2 es fotodañado por muchos FS comúnmente usados en estudios clínicos de TFD (Kim et al. 1999)(Kessel & Castelli 2001). La pérdida de la función de Bcl-2 libera Beclina-1, de esta forma conduce a la activación de la autofagia (Dewaele et al. 2011a).

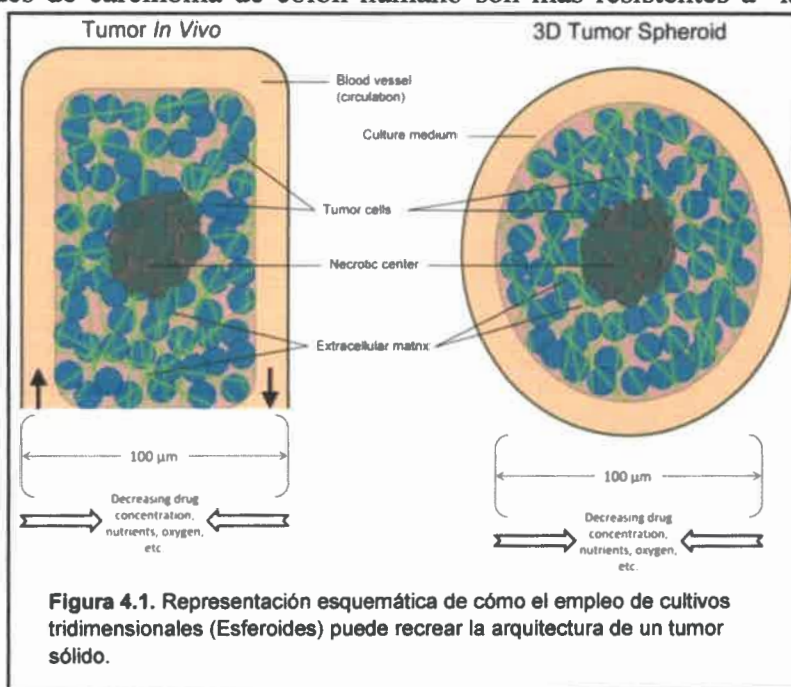
Por otro lado se ha demostrado que TFD induce un incremento de la expresión y activación de HIF-1a (Ferrario et al. 2000)(Agostinis et al. 2011b)(Weijer et al. 2015). Los niveles de EROs tienen un importante impacto sobre la respuesta mediada por HIF-1 (Diebold et al. 2010). Un aumento en los niveles de EROs sirven como molécula señal que inducen la expresión de este factor en una amplia variedad de tipo celulares.

HIF-1 es un regulador master en la respuesta adaptativa a la hipoxia e influencia la transcripción de cientos de genes incluyendo, las proteínas BNIP3 y BNIP3L, dos inductores de autofagia. De esta forma, la inducción de BNIP3/BNIP3L por HIF-1, puede liberar beclina-1 de su interacción con Bcl-2, estimulando la autofagia (Bellot et al. 2009).

Si bien la TFD es capaz de inducir tanto hipoxia como autofagia, como se mencionó anteriormente estos procesos son características de los tumores sólidos y pueden tener un profundo impacto sobre el efecto fotodinámico (Rabinowitz & White 2010)(Mizushima 2007)(Mathew, Kongara, et al. 2007).

El rol de la hipoxia tumoral en el contexto de la TFD puede ser estudiado *in vitro* empleando cultivos tridimensionales. Estos cultivos complejos intentan imitar la arquitectura tumoral recreando condiciones de hipoxia fisiológicas propias del tejido tumoral (Edmondson et al. 2014)(DelNero et al. 2015) y han sido una muy buena herramienta para evaluar la contribución de la hipoxia, autofagia, limitada difusión de fármacos, procesos de reparación y la respuesta de células a tratamientos particulares (West & Sutherland 1987) (**Figura 4.1**).

La resistencia de los cultivos en 3D (esferoides) a la TFD ha sido documentada, demostrando que esferoides de carcinoma de colon humano son más resistentes a la TFD con Hpd (West & Moore 1992). Estos resultados han sido confirmados en la línea RT-112 incubadas con hipercirina (Huygens et al. 2003), concluyendo que el gradiente de oxígeno de los esferoides produce poblaciones heterogéneas de células que difieren en su



respuesta a terapias dependientes de oxígeno como la TFD (Madsen et al. 2006).

Sin embargo, no hay un mecanismo claro que explique la resistencia a la TFD que se observa en los cultivos tridimensionales. Por otro lado, no hay reportes que demuestren el rol de la autofagia activada por HIF-1 *in vivo* en la respuesta de los tumores al tratamiento fotodinámico.

En este sentido, y basándonos en las evidencias mencionadas anteriormente, generamos un modelo que intenta explicar cómo los tumores sólidos activan vías de supervivencias como la autofagia, la cual podría, por lo menos en parte, ser responsable de que los tumores no respondan a la TFD de la misma manera que lo hacen los cultivos en monocapa y se esquematiza en la **Figura 4.2**.

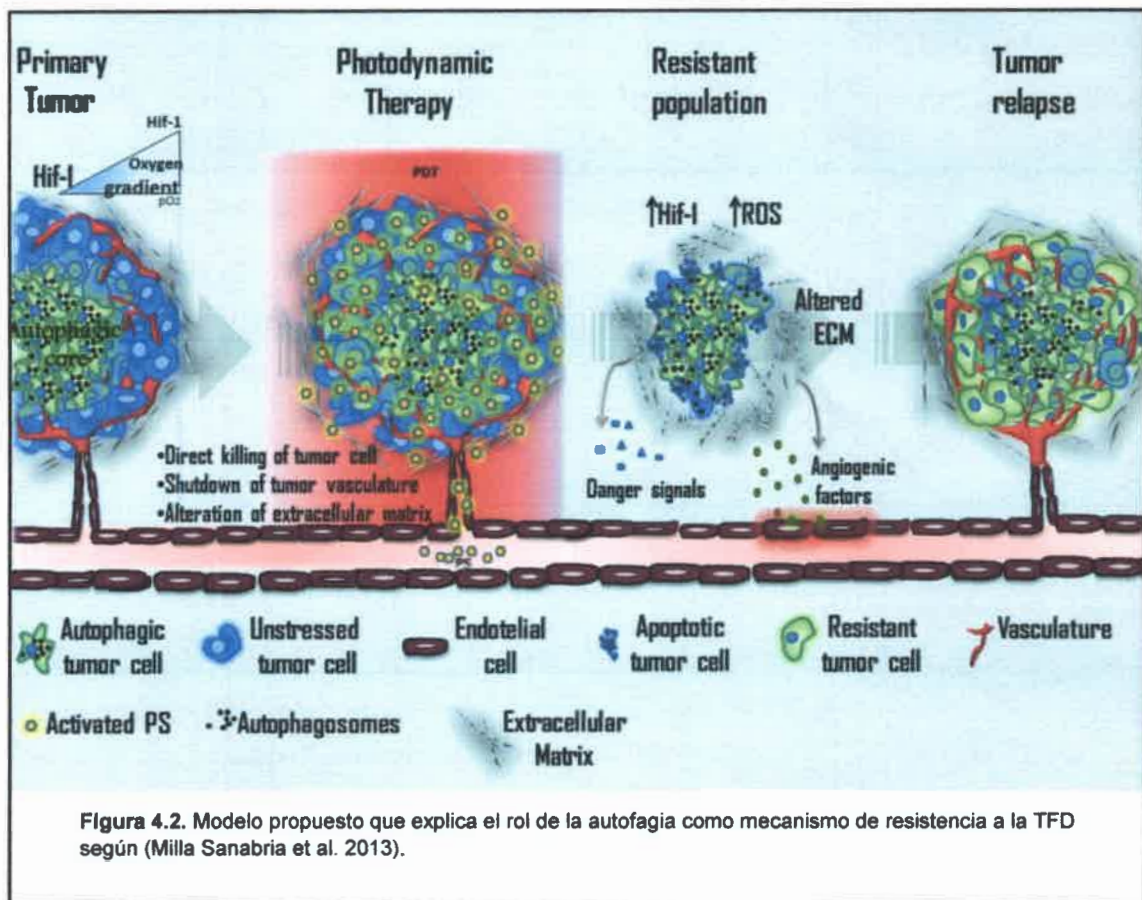
Según este modelo, las células en el centro hipóxico del tumor contienen características relacionadas con la resistencia a la TFD. La región hipóxica contiene una vasculatura deficiente lo cual dificulta la inclusión del FS. El efecto fotodinámico disminuye en las regiones poco oxigenadas (Henderson & Fingar 1989). Más aun, la actividad autofágica (Degenhardt et al. 2006) protege a las células de fotodaño y les permite sobrevivir luego de la destrucción de la vasculatura tumoral contribuyendo a la adaptación de las células

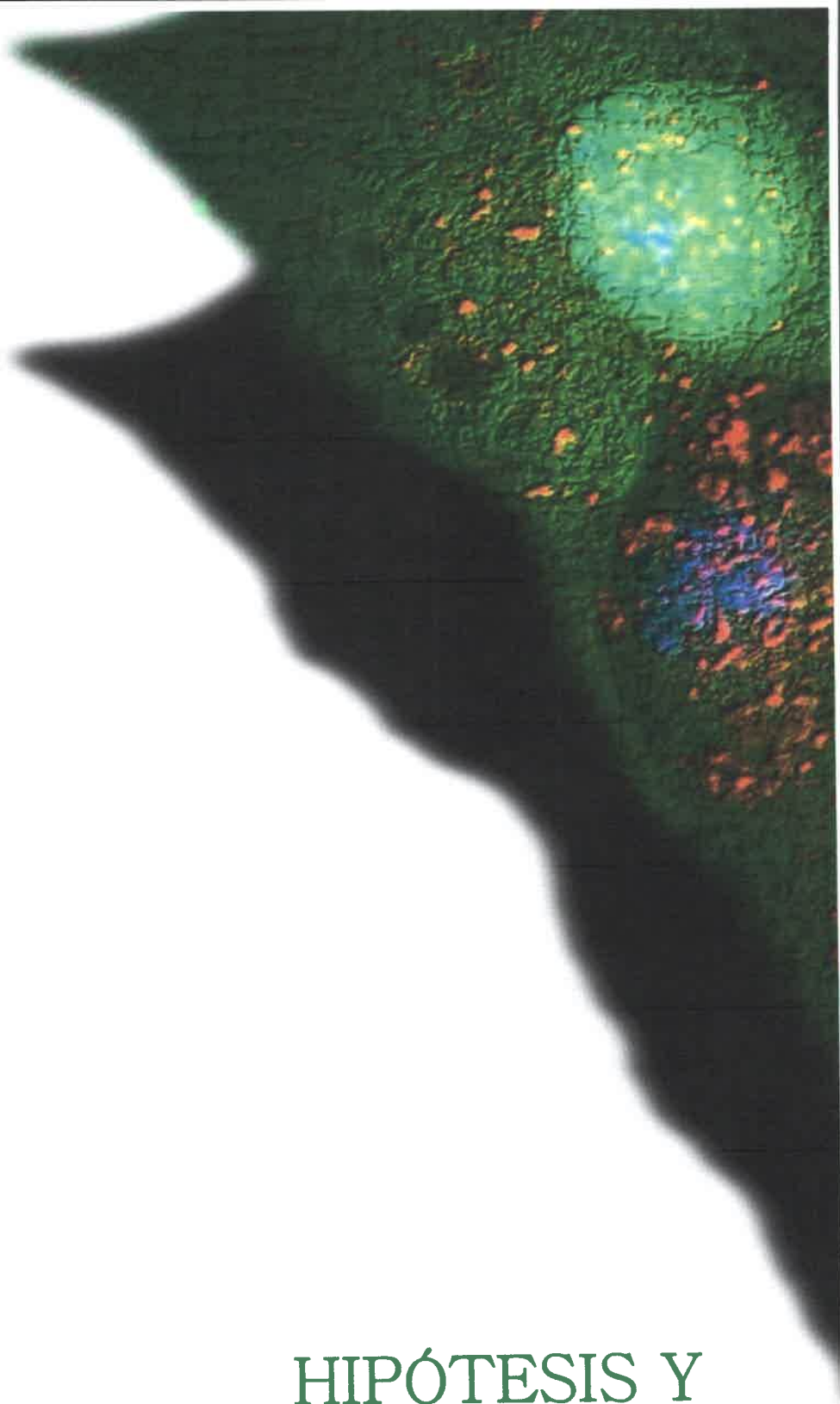
a su microambiente hostil y aumentar la resistencia de las células cancerosas sobrevivientes a subsecuentes ciclos de TFD (Reiners et al. 2010).

Esta población es el resultado de una fuerte presión de selección y capaz de generar un nuevo tumor (recidiva) con un fenotipo más agresivo y resistente.

En resumen, las células del tumor alteran numerosas vías metabólicas para mantener la homeostasis. La glicólisis aeróbica es necesaria para sobrevivir a un microambiente hipóxico, el cual está asociado tanto con la privación de nutrientes y producción de EROs. Todas estas alteraciones estimulan la activación de la autofagia (Eng & Abraham 2011).

En el siguiente trabajo estudiaremos el rol de la autofagia y su relación con la actividad de HIF-1 en respuesta a la TFD y como mecanismo activado por hipoxia, en modelos de cultivo 2D, 3D e *in vivo* de carcinoma colorrectal.





HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La terapia fotodinámica en el microambiente tumoral, genera una respuesta diferente en las células hipóxicas del tumor, en las que se activa la vía autofágica mediada por HIF-1 para sobrevivir a un microambiente hostil.

Por lo tanto, el bloqueo del proceso autofágico aumenta la eficiencia de la TFD

Objetivos

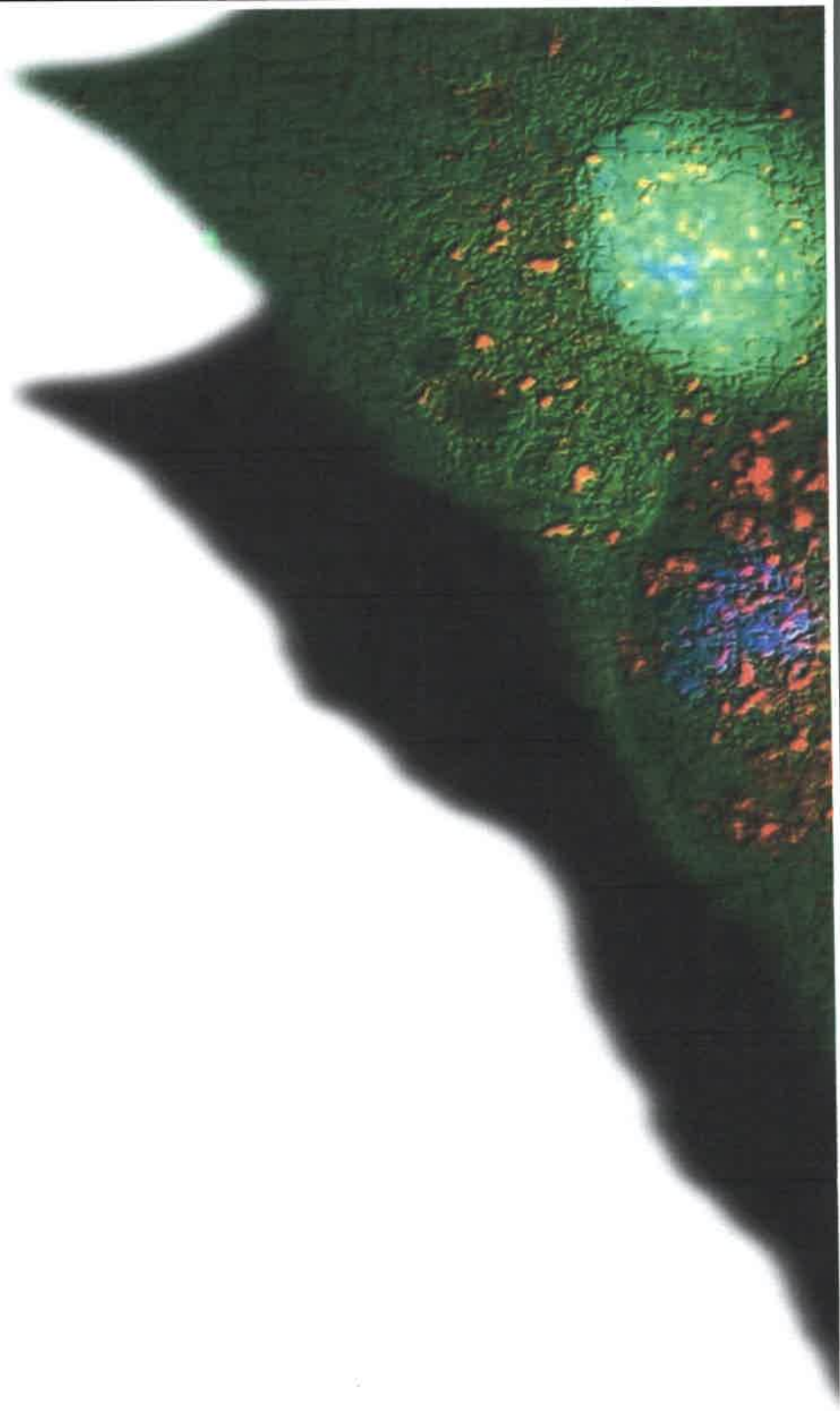
Objetivo general

Dilucidar la base molecular de la autofagia como vía de supervivencia inducida por la TFD y/o el microambiente tumoral en modelos de cultivo 2D, 3D e in vivo. Su implicancia en la promoción tumoral y resistencia a la terapia fotodinámica.

Objetivos específicos

- 1- Determinar las bases moleculares de la autofagia activada por HIF-1 α . Posible implicancias de la vía HIF-1 α como moduladora de autofagia a través de la expresión de VMP1. Determinar si la inhibición de HIF-1 α altera la respuesta autofágica. Evaluar si el silenciamiento de genes esenciales del proceso autofágico con RNA de interferencia optimiza el efecto de la Terapia Fotodinámica.
- 2- Determinar si la terapia fotodinámica es capaz de inducir actividad de HIF-1 α y autofagia. Evaluar el rol de estas vías en la respuesta celular al tratamiento.
- 3- Determinar activación de HIF-1 α /autofagia en sistemas de cultivos tridimensionales. Evaluar su rol en la respuesta al tratamiento.

4- Determinar el rol de HIF-1 α como modulador de autofagia *in vivo*. Determinar si el bloqueo de la vía autofágica aumenta la eficiencia de la TFD empleando ratones nude.



MATERIALES Y
MÉTODOS

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Medio de crecimiento para cultivos celulares: Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con glucosa 1 X (Gibco), suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Gibco), 1 % v/v de glutamina (GlutaMAX™ 100X – Gibco), 1 % v/v de antibiótico-antimicótico (PenicilinaG 10 µg/ml - esteptomicina 25 µg/ml - anfotericina B. Gibco) y 1 % v/v de piruvato de sodio (Hyclone®).

5.1.2. Medios y reactivos para cultivo bacteriano: Para el crecimiento bacteriano se utilizó medio Luria Broth (LB) líquido (1 % p/v triptona, 0,5 % p/v extracto de levaduras, 1%p/v NaCl), LB agar (LB líquido mas 1,5 % p/v Agar) y Caldo Súper Óptimo com Represión Catabólica (SOC) (2 % p/v triptona, 0,5 % p/v extracto de levadura, 10 mMNaCl, 2,5 mMKCl, 10 mM MgCl₂, 20 mMglucosa). Los reactivos fueron adquiridos en Britania. Todos los medios fueron esterilizados por autoclavado. La Ampicilina se utilizó en una concentración 100 µg/ml y fue adquirida en Genbiotech y la kanamicina se utilizó 25 µg/ml y fue obtenida en Invitrogen. El Isopropil-β-D-tiogalactosa (IPTG) fue adquirido a Promega y se utilizó 1 mM.

5.1.3. MTT. 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio. Sigma.

5.1.4. Anticuerpos: anticuerpo monoclonal anti-HIF-1a (Sigma), anticuerpo monoclonal anti-LC3B (Cell Signalling), anticuerpo monoclonal anti-p62 (Cell Signalling), anticuerpo policlonal anti-VMP1 (cedido por la Dra. Vaccaro), anticuerpo monoclonal anti-β-actina (Sigma), anticuerpo monoclonal anti-β-tubulina (Sigma), anticuerpo anti-Ig G de ratón HRP (Amersham) y anticuerpo anti-Ig G de conejo HRP (Sigma). Anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG (H+L) conjugado a Alexa Fluor® 594 (Thermo Scientific™).

5.1.5. Compuesto fotosensibilizador: El compuesto utilizado en este estudio fue el derivado metilado del ácido 5-aminolevulínico: ALA-Met (delta-aminoleavulinic acid methyl ester hydrochloride (Sigma). El mismo se empleó como un precursor del fotosensibilizador Protoporfirina IX (PpIX).

5.1.6. Plásmidos: RFP-LC3, (cedidos por la Dra. Colombo de la Universidad Nacional de Cuyo); pCMS3-H1p-EGFP conteniendo un shRNA contra VMP1 (cedidos por la Dra. Vaccaro de la Universidad de Buenos Aires); pZ-Green (cedido por el Dr. Pablo Bosch de la Universidad Nacional de Río Cuarto); pLenti-RFP-LC3 (cedido por el Dr. Jianbo Yue de la Universidad de Hong Kong); pLKO.1-Scr y pLKO.1-shHIF-1 α (cedidos por el Dr. Eric Metzen del Primer Hospital de la Universidad de Jilin. China), p5HRE-EGFP (cedido por el Dr. Scott Gerber de del Universidad de Yale. USA).

5.1.7. Reactivos de transfección: FuGENE 6 (Promega) y .Polietilenimina (PEI) (Sigma).

5.1.8. Inductores/inhibidores de autofagia: Rapamicina (Sigma) y 3-Metiladenina (InVivoGen) Wortmanina (Sigma), Cloroquina (InVivoGen), EBSS (Gibco).

5.1.9. Monodansylcadaverina (Sigma)

5.1.10. Irradiador

Para realizar los experimentos de TFD, las células fueron irradiadas con un aparato dotado de un sistema de iluminación de multiLEDs (luz coherente), con una longitud de onda de 636 nm. La intensidad de irradiación de la lámpara fue de 1,653 mW/cm².

5.2 MÉTODOS:

5.2.1. Bacterias competentes

Se produjeron bacterias competentes *E.coli*JM109 o *E.coli*BL21 por el método de CaCl₂. Se creció un cultivo O.N. a 37°C en 3 ml de medio LB con agitación, utilizando una colonia crecida en una placa fresca (hecha el día anterior). Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 en un volumen final de 20 ml del cultivo O.N. Se creció hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,5. Se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet en 10 ml de 0.1M CaCl₂. Luego se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 1 ml de 0.1M CaCl₂. Se utilizaron alícuotas de 200 µl para cada transformación.

5.2.2. Transformación

Se mezclaron 200 µl de bacterias competentes con 50 ng de DNA y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Luego se pasaron a 42°C durante 45 segundos y se agregó 1 ml de medio SOC. De dejaron 1 hs a 37°C con agitación y luego se plaquearon en medio agar LB + ampicilina o kanamicina según la resistencia del plásmido.

5.2.3. Miniprep

Para la purificación de plásmido se utilizó el Kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA PurificationSystem (Promega). Las bacterias que poseían el plásmido deseado se cultivaron en 7 ml de medio LB líquido con antibiótico a 37°C con agitación O.N. Al día siguiente se centrifugó el cultivo y se resuspendió el pellet en buffer de resuspensión. A continuación se agregó buffer de lisis incubándose durante 5 minutos y posteriormente se agregó la solución de neutralización. Luego se centrifugó y se pasó el sobrenadante por una columna que une DNA. Finalmente se lavó la columna 2 veces con buffer de lavado y se eluyó el DNA pegado a la columna con agua. La concentración de DNA obtenida se determinó por absorbancia a 260 nm.

5.2.4. Cultivos celulares

Se emplearon las líneas celulares CaCo2 (carcinoma de colon de estadio I), SW480 (carcinoma de colon de estadio I) y HEK293T (Embrionarias de riñon humano expresando el antígeno T de sv40). Se incubaron a 37° y 5% de CO₂.

5.2.5. Generación de los esferoides

Se hizo de acuerdo al protocolo de Laib et al. 2009. Con la finalidad de acondicionar de las placas de 96 pocillos con fondo en U. Se preparó agarosa al 1% en PBS estéril con la que luego se cubrieron las paredes de cada pocillo y se dejaron reposar durante 30 minutos con la finalidad de que la agarosa solidifique. Luego se sembraron 1.000 – 40.000 células/pocillos de células CaCo2 y SW480 en medio completo y las placas se incubaron en estufa de cultivo durante 96 hs. Los esferoides contenidos en las placas se fotografiaron a las 24, 48, 72 y 96 hs de formación con cámara monocromática refrigerada Nikon modelo DS-Qi1 U3 en microscopio invertido de fluorescencia Nikon Ti-S.

5.2.6. Expresión de HIF-1 α y marcadores de flujo autofágico luego del tratamiento con CoCl₂ o terapia fotodinámica mediante Western Blot.

Con la finalidad de analizar la expresión de HIF-1 α y LC3 luego del tratamiento con CoCl₂, células CaCo2 y SW480 (10x10⁴ cel/ml) se sembraron en placas de 60-mm. Luego de 24 hs el medio de cultivo fue reemplazado por medio completo conteniendo CoCl₂ (100, 200 o 400 μ M) y se incubaron durante 24 hs, por otro lado las células se incubaron con 200 μ M de CoCl₂ durante 6, 12 o 24 hs. Con la finalidad de determinar expresión de HIF-1 α , LC3, p62 y VMP1 luego de la TFD. Células CaCo2 y SW480 se trataron con terapia fotodinámica según lo especificado anteriormente y se realizó extracción de proteínas luego de 30 min, 1hs, 3hs, 6hs, 12hs y 24hs.

Luego de cada tratamiento se recolectaron las proteínas con buffer RIPA (150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 0.1 % SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7.2, 5 mM EDTA, Phosphatase and Protease Inhibitor Cocktail [Sigma-Aldrich]) y se analizaron mediante SDS-PAGE y western blot. Células no tratadas se utilizaron como control y células cultivadas con medio de ayuno EBSS durante 4hs fueron empleadas

como control positivo de autofagia. El contenido de proteínas fue determinado usando el kit de BSA de Pierce según protocolo del fabricante. Cantidades equivalentes de proteínas fueron separadas en geles de poliacrilamida y transferidas a membranas de PVDF (0,22 μm , Millipore). Luego las membranas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hs con buffer de boque (Leche descremada al 5% en buffer fosfato salino (PBS)). Seguidamente, las membranas se incubaron “overnight” a 4°C con el anticuerpo primario. La unión del anticuerpo primario fue detectada con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HPR) por incubación a temperatura ambiente durante 2 hs. La reacción de quimioluminiscencia se llevó a cabo usando el Kit ECL de Amersham según instrucciones del fabricante. Las bandas fueron cuantificadas empleando el software ImageJ.

5.2.7. Ensayo de actividad transcripcional de HRE-EGFP

La actividad transcripcional de HIF-1 fue evaluada usando el plásmido de promotor reportero 5HRE-EGFP conteniendo 5 secuencias HRE (Elementos de Respuesta a Hipoxia) en tándem y un promotor mínimo CMV “upstream” del gen reportero que codifica la proteína EGFP, como fue previamente descrito por Vorderman y col. (Vordermark, Shibata, & Brown, 2001). Células CaCo2 fueron transfectadas transitoriamente empleando FuGENE como reactivo de transfección según instrucciones del fabricante. Luego de 24 hs de realización de la transfección, el medio de cultivo fue reemplazado por medio completo conteniendo 200 μM de CoCl_2 . La expresión de EGFP fue analizada luego de 24 hs de incubación en estufa de cultivo, mediante microscopía confocal. Para la tinción nuclear las células se incubaron con Hoechst 33342 (Cell Singnaling) durante 10 min a temperatura ambiente.

5.2.8. Inmunofluorescencia indirecta

Células creciendo en cubreobjetos se trataron con TFD o CoCl_2 . Luego fueron fijadas con metanol frio durante 10 min a 4°C. El bloqueo de uniones no específicas se realizó mediante incubación albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBST “overnight”. Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo anti-LC3 (dilución: 1:200). El

anticuerpo primario fue detectado con el anticuerpo secundario anti-rabbit conjugado a Alexa Fluor® 594 (dilución: 1:50). Para la tinción nuclear las células se incubaron con Hoechst 33342 (Cell Singaling) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se montaron los vidrios con DABCO y las células se observaron y fotografiaron utilizando un microscopio confocal (Olympus FV1000).

5.2.9. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

El ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina fue realizado según el protocolo del Kit ChIP de Pierce Agarose de Thermo Scientific. Células CaCo2 (3×10^6) fueron fijadas con 1% de formol agregado directamente al medio de cultivo durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego las células lavadas y despegadas con PBS y colectadas por centrifugación a 800 g por 5 minutos a 4°C, resuspendidas en buffer de lisis celular e incubadas en hielo durante 15 minutos. El pellet resultante fue resuspendido en buffer de lisis nuclear y el ADN cortado (Shearing) en fragmentos de 700 bp. Las muestras fueron inmunoprecipitadas usando el anticuerpo anti-HIF-1 α (BD Bioscience) o anti-rabbit IgG (Pierce Agarose, Thermo Scientific) a 4°C “overnight” en una rueda giratoria. Luego de la inmunoprecipitación las muestras se lavaron y eluyeron usando el Kit de inmunoprecipitación de cromatina según las instrucción del fabricante. El entrecruzamiento fue removido a 62°C durante 1,5 hs y el ADN inmunoprecipitado fue purificado (Pierce Agarose ChIP Kit, Thermo Scientific) y subsecuentemente amplificado por PCR. La PCR fue realizada usando tres juegos de primers para las tres áreas conteniendo potenciales sitios de unión a HIF-1 α en el promotor de VMP1: 1) ACCCAGTGAGACCTCATCTTT (sense) y CACTCCATTGAGATATGGGACA (antisense); 2) GCCCGCACTAAGAGCCTAAC (sense) y CCCCAATTCCCTGAGTTAGTT (antisense); 3) GAGCCCTTGGAGAGGAACTT (sense) y CATGGAGTTGCAGGTAAATAAAAG (antisense). Los productos de la PCR fueron visualizados en gel de agarosa 1.5%.

5.2.10. Determinación de la viabilidad celular

La viabilidad celular fue estimada a través del ensayo colorimétrico de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5 difenilbromuro de tetrazolio, (MTT) (Mosmann y Tim, 1983); éste es un método indirecto que permite estimar la capacidad de las mitocondrias para convertir la sal de tetrazolio en un producto coloreado denominado formazán que puede medirse espectrofotométricamente (λ 540 nm). Las células vivas poseen los componentes respiratorios mitocondriales funcionales para convertir el MTT en formazán. Por el contrario, las células muertas no poseen actividad mitocondrial y por lo tanto no pueden realizar esta reacción. Dicho de otro modo, las células vivas tienen la capacidad para reducir mayor cantidad de formazán, o sea mayor intensidad de color, que las células muertas. Se preparó una solución stock de 5 mg/ml de MTT disuelto en PBS estéril. Para la determinación de viabilidad de células crecidas en monocapa se agregó 10 μ l de la solución stock a cada pocillo de placa p 96 conteniendo 100 μ l de medio de cultivo (ver detalles en METODOS: terapia fotodinámica).

Determinación de viabilidad en esferoides tumorales. Los esferoides (tratados o controles) se recolectaron y se transfirieron a una placa de 24 pocillos (8 esferoides por pocillo) en medio completo. Seguidamente se agregó 100 μ l a cada pocillo de la solución stock de MTT y las placas se incubaron durante 3 hs en estufa de cultivo. Luego los esferoides se recolectaron en tubos eppenforf de 1,5 ml (8 esferoides por tubo) y se centrifugaron durante 5 minutos a 10.000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de DMSO para disolver la sal de formazán. Se agregó 100 μ l de la solución de formazán en cada pocillo de placas p96 y de determinó la absorbancia con un fotómetro MultisKam FC Photometer (Termo Scientific) a 540 nm.

5.2.11. Terapia Fotodinámica

Con la finalidad de determinar dosis de tratamiento sub-letales en células CaCo2 y SW480, se determinó el porcentaje de viabilidad celular luego del tratamiento fotodinámico mediante el ensayo de MTT. Células CaCo2 y SW480 (10×10^4 cel/ml) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron en estufa durante 24 hs. Seguidamente se incubaron con 1 mM de ALA-Met (solución stock de 100 mM en

PBS) en medio de cultivo sin suero durante 4 hs (en estufa de cultivo) y se irradiaron con 1, 2, 3, 4, y 5 J/Cm² (n: 8 pocillos p/ tratamiento). Luego de la irradiación el medio de cultivo fue remplazado por medio completo. 24 hs luego de la irradiación se agregó 10 µl de la solución de MTT (5 mg/ml en PBS) a cada pocillo conteniendo 100 µl de medio completo. Las placas se incubaron durante 3 hs en estufa de cultivo y posteriormente los cristales de formazán fueron disueltos en DMSO. Se midió la absorbancia de las muestras con un fotómetro MultisKam FC Photometer (Termo Scientific) a 540 nm. La absorbancia de células controles se consideró 100% de viabilidad. La citotoxicidad fue expresada como porcentaje de viabilidad con respecto al control. Los datos se expresan como promedio ± DE de 3 experimentos independientes. *P < 0.05.

Para el tratamiento fotodinámico de los esferoides, los mismos se recolectaron de las placas p96 y se transfirieron a una placa de 24 pocillos (8 esferoides por pocillo). Luego se incubaron con 500 µl de medio de cultivo sin suero conteniendo diferentes concentraciones de ALA-Met (1, 2, 3 y 4 mM) durante diferentes tiempos (4, 8 y 12hs). Luego fueron irradiados con 1, 2, 3, 4 y 5 J/Cm². Posteriormente a la irradiación se realizó recambio de medio por medio completo y se incubaron en estufa de cultivo durante 24 hs para luego evaluar porcentaje de viabilidad mediante MTT. Los datos se expresan como promedio ± DE de 3 experimentos independientes. *P < 0.05.

5.2.12. Evaluación de la resistencia a la terapia fotodinámica empleando activadores o inhibidores de autofagia

Con el objetivo de determinar si la autofagia está asociada a la resistencia a la TFD se sembraron células CaCo2 y SW480 (10x10⁴ cel/ml) en placas de 96 pocillos y se incubaron “overnight” en estufa de cultivo. Luego se incubaron con 1 mM de ALA-Met + (5 mM de3-Ma, 100 nM de WM, 10 µM de CQ o 100 nM de Rapa) durante 4 hs. Luego fueron irradiadas con dosis de luz predeterminadas seguido de recambio de medio completo + (5 mM de3-Ma, 100 nM de WM, 10 µM de CQ o 100 nM de Rapa) durante 4 hs. Posteriormente se realizó cambio de medio por medio completo. 24 hs luego del tratamiento combinado se determinó porcentaje de viabilidad mediante MTT. Células sin tratamiento fueron utilizadas como controles de TFD. Células con 5 mM de

3-Ma, 100 nM de WM, 10 μ M de CQ o 100 nM de Rapa sin tratamiento fotodinámico se utilizaron como controles de sus respectivos tratamientos combinados. Los datos se expresan como promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. *P < 0.05.

Por otro lado, esferoides de CaCo2 y SW480 recolectados y transferidos a pocillos de placas p24 se incubaron con 4 mM de ALA-Met + (5 mM de 3-Ma, 100 nM de WM, 10 μ M de CQ o 100 nM de Rapa) durante 12 hs. Posteriormente se irradiaron y se cambió el medio de cultivo por medio completo + 5 mM de 3-Ma, 100 nM de WM, 10 μ M de CQ o 100 nM de Rapa “overnight”. Luego se determinó porcentaje de viabilidad mediante MTT. Esferoides incubados con 5 mM de 3-Ma, 100 nM de WM, 10 μ M de CQ o 100 nM de Rapa sin TFD se consideraron controles de los respectivos tratamientos combinados. Los datos se expresan como promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. *P < 0.05.

5.2.13. Silenciamiento de HIF-1 α /VMP1: evaluación de la actividad autofágica y respuesta a la TFD

Con la finalidad de evaluar si HIF-1 α o VMP1 modulan a actividad autofágica, células CaCo2 fueron sembradas en pocillos de placas p24 (10×10^4 cel/ml) e incubadas “overnight”. Posteriormente se transfectaron con los plásmidos pLKO.1-shRNA HIF-1 α (o pLKO.1-shRNA Scr) o shVMP1-EGFP (o pEGFP) empleando PEI como medio de transfección. En tubos eppendorf de 0,5 ml se mezclaron 40 μ l de C1Na 150 mM, 1 μ g de plásmido y 1 μ g de PEI. La mezcla fue incubada a 37°C durante 15 minutos y luego agregada a un pocillo de p24 conteniendo 500 μ l de medio completo que se incubaron durante 24 hs en estufa de cultivo. Luego de la transfección el medio conteniendo la mezcla se cambió por medio completo y se aplicó el tratamiento (TFD o CoCl₂). La expresión de HIF-1 α /VMP1 y LC3 se realizó mediante western blot.

Con el propósito de determinar el patrón de distribución subcelular de LC3 luego del silenciamiento de VMP1, células CaCo2 sembradas sobre cubreobjetos en pocillos de placas p24 (10×10^4 cel/ml) fueron co-transfectadas con shVMP1-EGFP y RFP-LC3 empleando PEI como reactivo de transfección. En tubos eppendorf de 0,5 ml se mezclaron 80 μ l de C1Na 150 mM, 1 μ g de plásmido shVMP1-EGFP, 1 μ g de plásmido RFP-LC3 y 2 μ g de PEI. La mezcla fue incubada a 37°C durante 15 minutos y luego

agregada a un pocillo de p24 conteniendo 1000 μ l de medio completo y se incubaron durante 24 hs en estufa de cultivo. Luego de la transfección las células fueron tratadas con TFD o CoCl_2 y se analizó la expresión de EGFP y RFP-LC3 en microscopio de fluorescencia directo Nikon modelo 50i y se fotografiaron con cámara monocromática refrigerada Nikon modelo DS-Qi1 U3.

Con la finalidad de analizar la implicancia de HIF-1 α /VMP1 en la resistencia a la TFD, células CaCo2 o SW480 se sembraron en pocillos de placas p24 (10×10^4 cel/ml) e incubaron “overnight”. Luego se transfectaron con los plásmidos pLKO.1-shRNA HIF-1 α (o pLKO.1-shRNA Scr) o shVMP1-EGFP (o pEGFP) empleando PEI como medio de transfección, según protocolo mencionada anteriormente. Luego se trataron con TFD o CoCl_2 y se determinó el porcentaje de viabilidad celular mediante MTT. Células no tratadas se consideraron como control de TFD. Células transfectadas sin TFD se consideraron controles de sus respectivos tratamientos combinados. Los datos se expresan como promedio \pm DE de 3 experimentos independientes. *P < 0.05.

5.2.14. Generación de la línea estable CaCo2G

Con la finalidad de generar la línea estable CaCo2G que expresa la proteína verde fluorescente Z-Green (proteína fluorescente derivada de *Zoanthus* sp), células CaCo2 (10×10^4 cel/ml) creciendo en pocillos de placas p24, se transfectaron con el plásmido pZ-Green empleando FuGENE como reactivo de transfección según instrucciones del fabricante. 72 hs luego de la transfección se evaluó la fluorescencia de Z-Green en microscopio de fluorescencia invertido Nikon Ti-S. Luego las células se incubaron con 800 μ M de G418, Geneticin® (Thermo Fisher Scientific) durante 21 días (recambio de medio con G418 cada 3 días). Posteriormente, las células se tripsinizaron y se sembraron en pocillos de placas p96 en dilución limitante (25; 12; 6; 3; 1,5; 1; 0,5 cel/pocillo) en medio de cultivo sin G418 y se incubaron durante 14 días. Posteriormente se analizaron los pocillos mediante microscopía de fluorescencia y se seleccionaron las colonias crecidas en los pocillos de 1 cel/pocillo y 0,5 cel/pocillo que expresaban Z-green. Seleccionamos una de estas colonias la cual se amplificó considerándose como la línea estable CaCo2G.

5.2.15. Determinación de formación de PpIX en esferoides

Con la finalidad de evaluar la fluorescencia PpIX en los esferoides, se generaron esferoides de CaCo2G de 72 hs de formación. Luego fueron recolectados y transferidos a pocillos de placas p24 (8 esferoides/pocillo) y se incubaron con 500 μ l de medio de cultivo 1% de suero con 1 mM de ALA-Met durante 4, 8 y 12 hs o 2, 3 y 4 mM de ALA-Met durante 12 hs. Posteriormente los esferoides se recolectaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se enjuagaron 3 veces con PBS 1X. Luego se descartó el sobrenadante de PBS y se agregó 100 μ l de medio de montaje DABCO y se transfirieron entre porta y cubreobjeto para ser analizados en microscopio confocal Olympus FV1000.

5.2.16. Tinción con Monodancilcadaverina (MDC)

Con la finalidad de evaluar la presencia de vesículas autofágicas, se generaron esferoides de CaCo2G 1.000, 5.000, 10.000 y 20.000 células. Luego de 72 hs de formación fueron recolectados y transferidos a pocillos de placas p24 (8 esferoides/pocillo) y se incubaron con 500 μ l de 0,05 mM de MDC en PBS durante 1 h a 37 °C. Posteriormente los esferoides se recolectaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se enjuagaron 3 veces con PBS 1X. Luego se descartó el sobrenadante de PBS y se agregó 100 μ l de medio de montaje DABCO y se transfirieron entre porta y cubreobjeto para ser analizados en microscopio confocal Olympus FV1000.

5.2.17. Generación de partículas virales

Los vectores lentivirales fueron producidos en células HEK293T por co-transfección utilizando PEI junto con 5 plásmidos en pocillos de placas p24. Para cada pocillo se preparó la siguiente mezcla: en tubos eppendorf de 1,5 ml se agregó: 40 μ l de ClNa 150 mM; 0,76 μ g de plásmido vector (pLKO.1-Scr, pLKO.1-shHIF-1 α o pLenti-RFP-LC3); 0,038 μ g de pREV; 0,038 μ g pTAT; 0,038 μ g de pGag/Pol; 0,076 μ g VSVG; 1 μ g de PEI. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 37 °C y luego se la adicionó a cada pocillo conteniendo 500 μ l de medio completo. Luego de 24 hs post co-transfección se

realizó cambio de medio. El medio conteniendo las partículas lentivirales fue recolectado 48 y 72 hs luego de la transfección, filtrado a través de filtros de 0,22 μm , concentrados por centrifugación a 13.000 rmp, durante 2 hs a 4 °C, alicuotados y congelados a -80°C. Los títulos virales fueron obtenidos sobre la base de la cantidad inicial de células diana y el porcentaje de células RFP+, detectados en un rango lineal de diluciones seriadas de las partículas re-suspendidas. El título viral se expresó en unidades transduccionales/ml se estimó en la línea HEK293T.

5.2.18. Transducción de células diana

Las células CaCo2 y SW480 fueron transducidas en pocillos de placas p24 a una confluencia de 1×10^5 células/pocillo. Los vectores fueron añadidos en concentraciones seriadas sobre un volumen final de 500 μl del medio de cultivo correspondiente. Las células se incubaron con los vectores 24 hs, se mantuvieron en cultivo durante 3 días tras los cuales se procedió a la detección de RFP en microscopio de fluorescencia invertido Nikon Ti-S.

Para la generación de las líneas estables que expresan un shRNA contra HIF-1 α , células CaCo2 y SW480 creciendo en pocillos de placas p24 se incubaron durante 24 hs en medio de cultivo completo conteniendo las partículas shHIF-1 α o shScr. Posteriormente se realizó recambio de medio por medio completo. 72 hs luego de la infección las células se incubaron con medio completo conteniendo 2 μM (SW480) u 8 μM (CaCo2) de puromicina (Sigma) durante 7 días. Luego las células fueron amplificadas en medio completo sin antibiótico y tratadas con CoCl_2 con la finalidad de confirmar el bloqueo de la expresión de HIF-1 α mediante western blot.

En la tabla 1 se resumen las líneas estables generadas a partir de la transducción con partículas lentivirales.

Tabla 1. Líneas celulares estables generadas mediante el sistema lentiviral

Nombre	Constructo incorporado	Aplicación	Resistencia a antibióticos
CaCo2Scr	pLKO.1-Scr	Control de infección. shRNA inespecífico.	Puromicina
CaCo2shH	pLKO.1-shRNA.HIF-1 α	Expresan el shRNA contra HIF-1 α .	Puromicina
SW480Scr	pLKO.1-Scr	Control de infección. shRNA inespecífico.	Puromicina
SW480shH	pLKO.1-shRNA.HIF-1 α	Expresan el shRNA contra HIF-1 α	Puromicina
SW480-RL	pLenti-RFP-LC3	Reporta formación de autofagosomas	-
SW480shH-RL	pLKO.1-shRNA.HIF-1 α pLenti-RFP-LC3	Reportan formación de autofagosomas en células expresando shRNA contra HIF-1 α .	Puromicina
SW480-HRE-RL	pLenti-RFP-LC3 p5HRE-EGFP	Reporta actividad de HIF-1 y formación de autofagosomas	Geneticina
SW480-HRE-shH	p5HRE-EGFP pLKO.1-shRNA.HIF-1 α	Reporta actividad de HIF-1 en células expresando shRNA contra HIF-1 α .	Geneticina Puromicina

5.2.19. Determinación de generación de sitios hipóxicos en esferoides tumorales y distribución de RFP-LC3

Con la finalidad de determinar la actividad transcripcional de HIF-1 (hipoxia) se generaron esferoides de SW480-HRE-RL de 5.000-40.000 células. Luego de 72 hs de formación los esferoides se recolectaron en tubos eppendorf de 1,5 ml y se lavaron tres veces con PBS 1X. Luego se agregó 1 ml de paraformaldehído (Sigma) al 4% en PBS y

se fijaron “overnight” a 4 °C. Posteriormente, se descartó el paraformaldehído y los esferoides se lavaron tres veces con PBS 1X. Se agregó 100 µl de medio de montaje DABCO a cada tubo y los esferoides se transfirieron entre porta y cubreobjeto para ser analizados en microscopio confocal Olympus FV 1000.

5.2.20. Ensayos de crecimiento tumoral *in vivo*

Todos los experimentos realizados *in vivo* con el modelo experimental de ratones inmunodeprimidos fueron realizados después de la aprobación del correspondiente protocolo por el comité ético de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Se utilizaron ratones de ~22 gr mantenidos a una temperatura de 25 °C, fotoperiodo de 12 hs de Luz y 12 hs de oscuridad y con comida y agua *ad libitum*.

Para la generación de tumores, células SW480, SW480-HRE-RL, SW480Scr o SW480shH fueron inoculadas por vía subcutánea (3 millones de células/0,1 ml PBS). El tamaño tumoral se controló utilizando calibre milimétrico determinando el volumen tumoral (mm^3) según la fórmula $(P^2 \times L) / 2$, donde P es la profundidad and L es la longitud (mayor) (Euhus et al., 1986). Los datos se graficaron como Volumen Tumoral Relativo (VTR) y fue calculado según la fórmula: $\text{TVR} = \text{TVn}/\text{TV0}$, donde TVn es el volumen del tumor al día n y TV0 es el volumen del tumor al día 0 (Anon n.d.).

Para la evaluación de la expresión de EGFP y RFP-LC3, los tumores de 3 días de formación fueron extraídos y fijados durante un mínimo de 24 hs en formol tamponado al 10% a temperatura ambiente. Cada pieza se colocó en un casete y se incluyó en parafina. A partir de los bloques de parafina se obtuvieron secciones del tejido tumoral de 5 µm de grosor. Para su evaluación, las secciones se desparafinaron en xilol y siguieron un proceso de hidratación pasando por una serie de alcoholes de gradación decreciente hasta agua. Las preparaciones se montaron con medio DABCO y cubreobjetos y fueron analizadas en microscopio confocal Olympus FV 1000.

Para la evaluación de la respuesta tumoral a la TFD, a los tres días de crecimiento tumoral (tumor de ~5 mm^3) los ratones se separaron en 4 grupos, a los que se trataron seleccionando las diferentes pautas: - Grupo1: control. - Grupo2: TFD/ALA-met 250 mg/Kg. - Grupo 3: Cloroquina 20mg/Kg diario. - Grupo4: TFD/ALA-Met 250 mg/Kg + Cloroquina 20 mg/Kg diario. El experimento duró 17 días. Los fármacos ALA-Met y

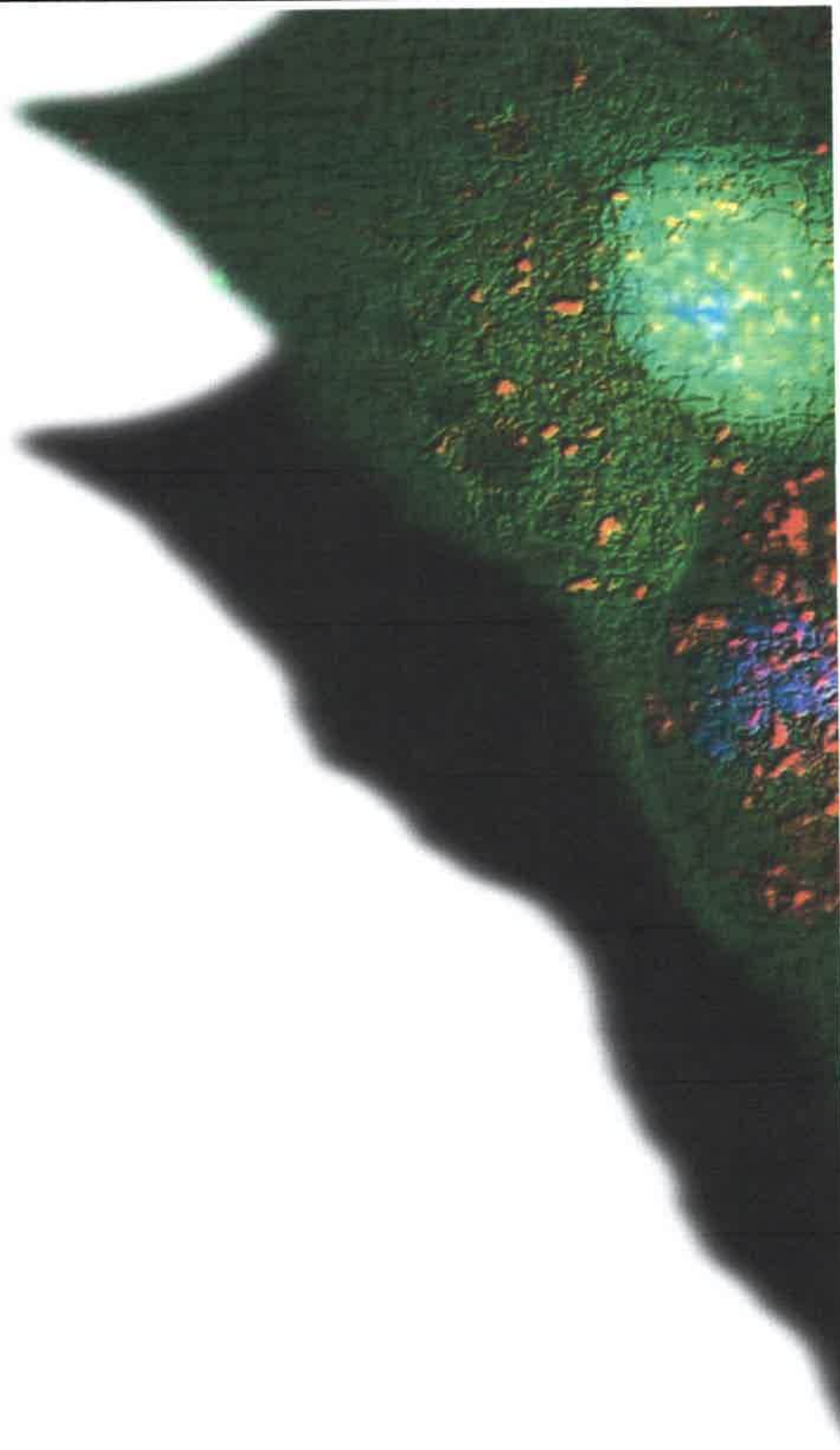
Cloroquina se disolvieron en PBS y fueron administrados mediante inyección intraperitoneal.

5.2.21. Image J

Todas las imágenes de fluorescencia, western blot y generación de paneles de imágenes fueron analizadas con el software ImageJ. Para el conteo del número de vesículas autofágicas, las imágenes obtenidas por microscopía confocal fueron deconvolucionadas utilizando el plugin “Parallel Spectral Deconvolution” y se aplicó el conteo automático de partículas.

5.2.22. Análisis estadístico

Se utilizó el software GraphPad. Se aplicó el análisis de varianza de un factor (ANOVA). Para identificar cuáles fueron los tratamientos diferentes entre sí se aplicó el análisis de comparaciones múltiples a posteriori de Bonferroni.



RESULTADOS Y
DISCUSIÓN

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. El Factor Inducible por Hipoxia induce autofagia a través de VMP1

La respuesta celular a la hipoxia depende principalmente de la activación del Factor Inducible por Hipoxia HIF-1, el cual modula la expresión de genes involucrados en la angiogénesis, supervivencia, metabolismo y migración celular (Goldberg & Schneider 1994; Pennacchietti et al. 2003). En situación de hipoxia, las hidroxilasas inhibitorias de HIF-1a se inactivan permitiendo la estabilización, translocación nuclear y activación de HIF-1 (Dímero HIF-1 α y HIF-1 β). Por otro lado, la actividad enzimática de las hidroxilasas puede ser bloqueada empleando metales de transición como el Cobalto, en este sentido, el Cloruro de Cobalto (CoCl₂) ha sido ampliamente utilizado como “Inductor químico de hipoxia” y permite evaluar la respuesta celular mediada por el factor HIF-1 (Ji et al. 2006)(Al Okail 2010).

La hipoxia es una característica común de los tumores sólidos y HIF-1 es el principal mediador de la respuesta adaptativa al microambiente tumoral hipóxico (Cairns et al. 2007; Gao & Chen 2015) además, ha sido fuertemente implicado en la resistencia tumoral a diversos tratamientos antitumorales (Warfel & El-Deiry 2014).

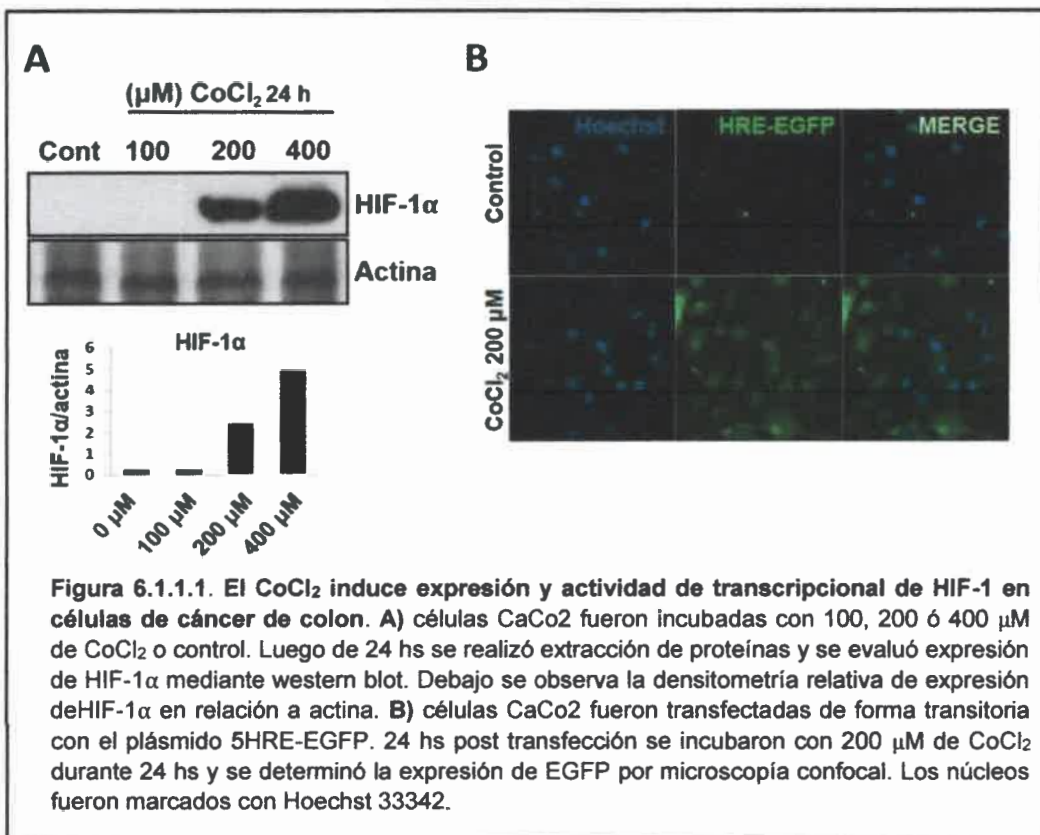
Si bien los eventos moleculares controlados por HIF-1 han sido extensamente estudiados, en la última década, se ha demostrado que la autofagia es uno de los mecanismos inducidos por HIF-1 en células tumorales, con un rol preponderante en el mantenimiento de la producción de ATP, síntesis de macromoléculas y además, representa un posible mecanismo de resistencia al tratamiento anti-cáncer (Amaravadi & Thompson 2007; Mathew, Karantza-Wadsworth, et al. 2007). Sin embargo, los detalles moleculares que controlan la autofagia inducida por HIF-1 no han sido totalmente explorados.

En este trabajo, se empleó un modelo de cáncer de colon utilizando las líneas tumorales CaCo2 y SW480 de carcinoma colorrectal humano, con la finalidad de investigar el mecanismo de regulación de la autofagia a través de HIF-1 y su implicancia en la resistencia a la Terapia Fotodinámica.

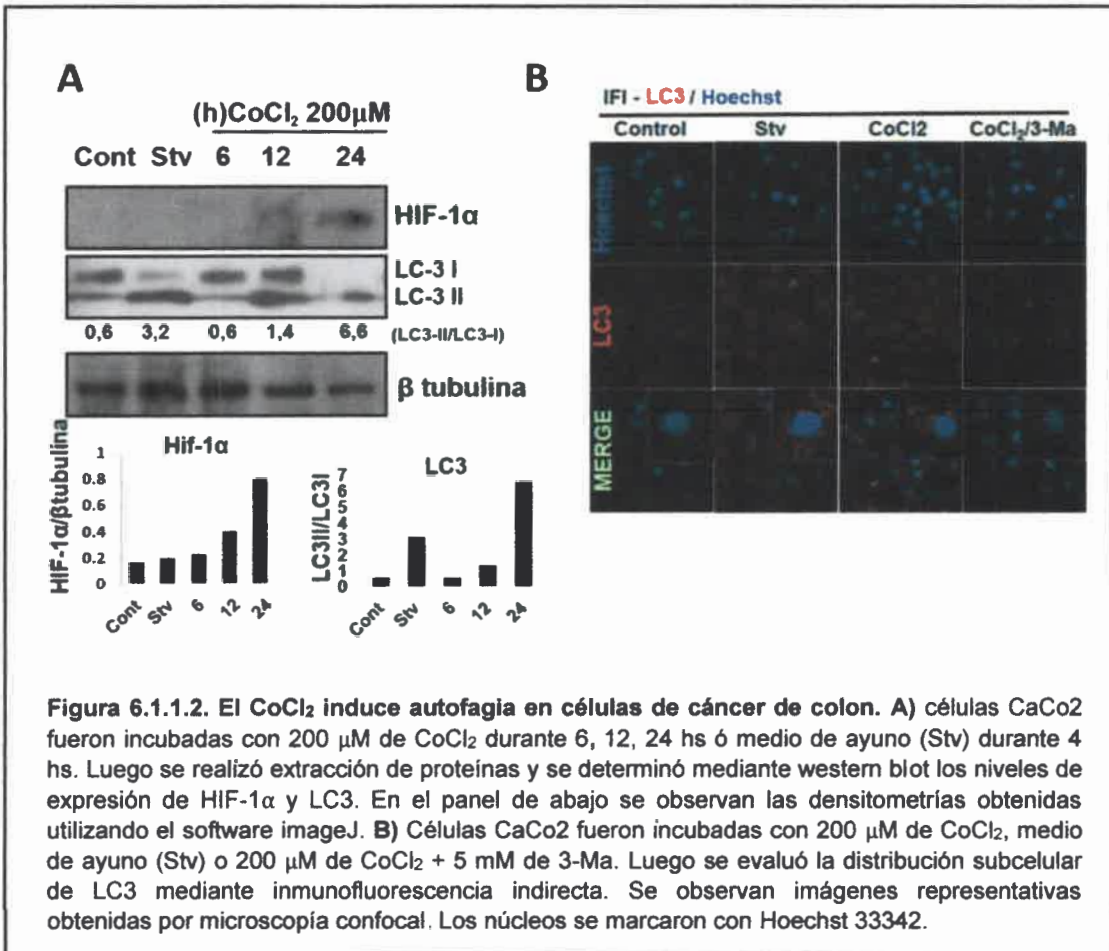
6.1.1 HIF-1 α induce autofagia en células de cáncer de colon

Con el fin de determinar si la sobreexpresión de HIF-1 α conduce a la activación de la autofagia en células de cáncer de colon, células CaCo2 se incubaron con 100 μ M, 200 μ M y 400 μ M de CoCl₂ y se determinó el nivel de expresión de HIF-1 α por western blot. En la **Figura 6.1.1.A** se puede observar que a mayor concentración del inductor químico, mayor nivel de expresión del factor.

La estabilización de HIF-1 α en citoplasma, permite su ingreso al núcleo en donde dimeriza con HIF-1 β e induce la transcripción de sus genes targets (Wenger et al. 2005). Con la finalidad de evaluar la actividad transcripcional del factor luego del tratamiento con CoCl₂, células CaCo2 se transfectaron transitoriamente con un plásmido p5HRE-EGFP y se incubaron con 200 μ M de CoCl₂ durante 24 hs. p5HRE-EGFP es un plásmido reportero de actividad de HIF-1 el cual reconoce los elementos HRE (elementos de respuesta a hipoxia) en el promotor de EGFP e induce su transcripción y expresión. Como se observa en la **Figura 6.1.1.B**, el CoCl₂ indujo actividad transcripcional de HIF-1.



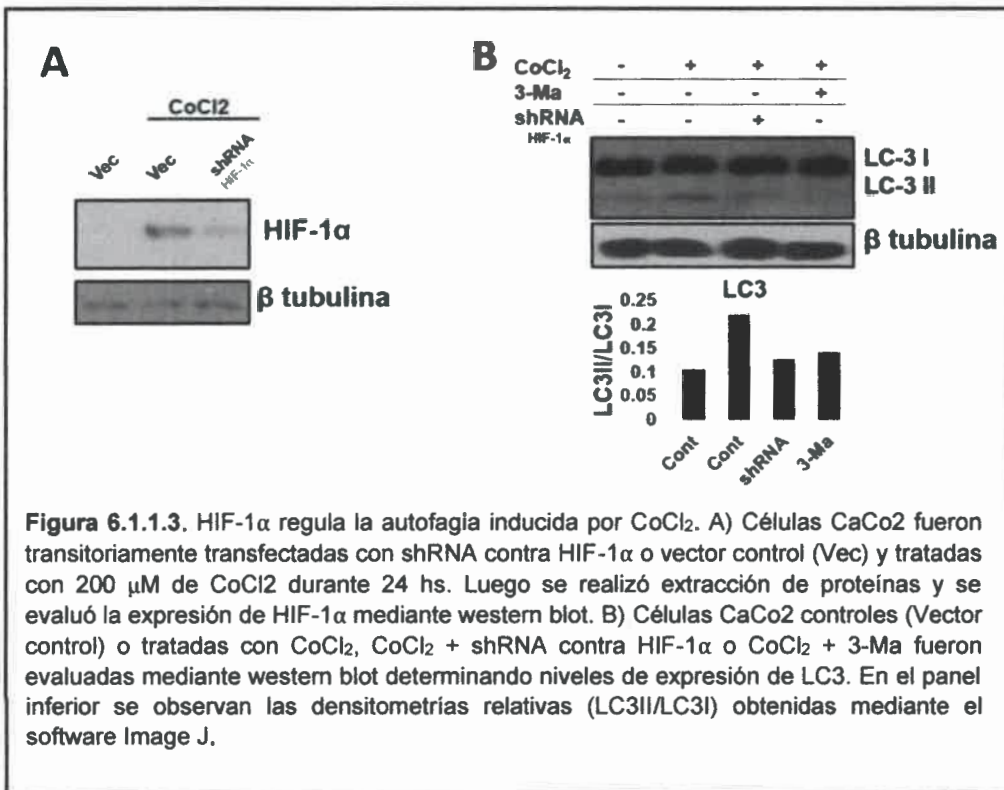
Posteriormente se estudió el rol de HIF-1 como mediador de autofagia. Durante la autofagia la proteína LC3 es procesada desde la forma de 18 kDa (LC3-I) a la forma de 16 kDa (LC3-II) la cual se localiza en la membrana de los autofagosomas. Por lo tanto un incremento en la relación LC3-II/LC3-I correlaciona con un incremento en el número de autofagosomas (Kabeya et al. 2000). Con el fin de estudiar la activación de la autofagia se evaluó el procesamiento y distribución subcelular de LC3 luego del tratamiento con CoCl_2 . Mediante western blot se determinó el nivel de expresión de LC3-I y LC3-II y mediante densitometría obtenida con el software Image J se obtuvo la relación LC3-II/LC3I. Se observó un incremento de LC3II/LC3I que fue acorde a la expresión de HIF-1 α de forma dependiente del tiempo de incubación con CoCl_2 (Fig. 6.1.1.2A).



Mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) evaluamos la distribución subcelular de LC3. Se observó agregación de LC3 en células incubadas con CoCl_2 , mientras que en células controles se mantuvo difusa en citoplasma. Como control positivo de autofagia

se utilizó medio de ayuno (Stv) y se empleó 3-Metiladenina (3-Ma) como inhibidor del proceso autofágico (**Fig. 6.1.1.2B**).

Para determinar si el aumento de la actividad autofágica en células incubadas con CoCl_2 esta mediada por HIF-1 α , mediante shRNA bloqueamos la expresión del factor de transcripción y evaluamos actividad autofágica en células tratadas con CoCl_2 . En la **Fig. 6.1.1.3A** se observa que células transfectadas con shRNA contra HIF-1 α , bloquearon eficientemente la expresión de la proteína. Además, en la **Fig. 6.1.1.3B** se observa, en concordancia con los resultados anteriores, que el bloqueo de HIF-1 α , disminuyó la relación LC3-II/LC3-I indicando un bloqueo de la vía autofágica. Estos resultados demuestran que HIF-1 es capaz de controlar la activación del proceso autofágico en células de cáncer de colon.



La activación de la autofagia dependiente de HIF-1 ha sido previamente demostrada en un amplia variedad de líneas celulares (Wilkinson et al. 2009)(Bellot et al. 2009) incluyendo células de cáncer de colon (Sun et al. 2015). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados siguen siendo poco comprendidos.

Se ha sugerido que HIF-1 es capaz de comandar la activación del proceso autofágico a través de la regulación del complejo PI3KIII. En este sentido, HIF-1 induce la

transcripción y expresión de BNIP3 y BNIP3L (a través de la unión a sus promotores) las cuales liberan Beclina1 de su interacción (inhibitoria) con Bcl-2 (Bellot et al. 2009). Aunque el mecanismo por el cual estas proteínas inducen autofagia no está completamente comprendido, han sido vinculadas, además, a la degradación de mitocondrias a través de la autofagia (Mitofagia) y esto se debe a su capacidad de actuar como receptores en la membrana mitocondrial, que interactúan con LC3 en la membrana de los autofagosomas (Shi et al. 2014). Por lo tanto, la activación constitutiva de HIF-1 puede resultar (aunque no en todos los casos) en una disminución de la masa mitocondrial como consecuencia de la activación del eje HIF-1/BNIP3(BNI3L) (Lisanti et al. 2010)(Shi et al. 2014). Por otro lado, recientemente Sun y colaboradores demostraron que bajo condiciones de hipoxia, HIF-1 puede inducir la expresión de miRNA-210 el cual a su vez inhibe la expresión de Bcl-2 en células de cáncer de colon (Sun et al. 2015), lo que demuestra una compleja interacción entre ambas vías. Teniendo en cuenta que la inducción de autofagia dependiente de HIF-1 ocurre independientemente de las condiciones nutricionales (puede ocurrir en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes) y que además la autofagia inducida por HIF-1 no necesariamente está relacionada a la degradación mitocondrial (Chiche et al. 2010) surge la necesidad de estudiar si existen otros componentes claves de la vía autofágica que puedan estar regulados por el factor HIF-1.

La proteína VMP1 es requerida para la formación de los autofagosomas en células de mamíferos y su función consiste en la estimulación de la formación del complejo PI3KIII a través de su interacción con Beclina1 (Capítulo 3). Además, resulta interesante que la sobreexpresión de VMP1 es suficiente para inducir autofagia incluso en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (Ropolo et al. 2007)(Itakura & Mizushima 2010)(Tian et al. 2010)(Grasso et al. 2011). Por estas razones proponemos que VMP1 podría ser un excelente candidato como mediador de la autofagia dependiente de HIF-1 α .

6.1.2. La proteína autofágica VMP1: un nuevo target de HIF-1

VMP1 es, hasta el momento, la única proteína ATG capaz de inducir autofagia (Vaccaro et al. 2008; Grasso et al. 2011; Grasso et al. 2009) y la inhibición de la

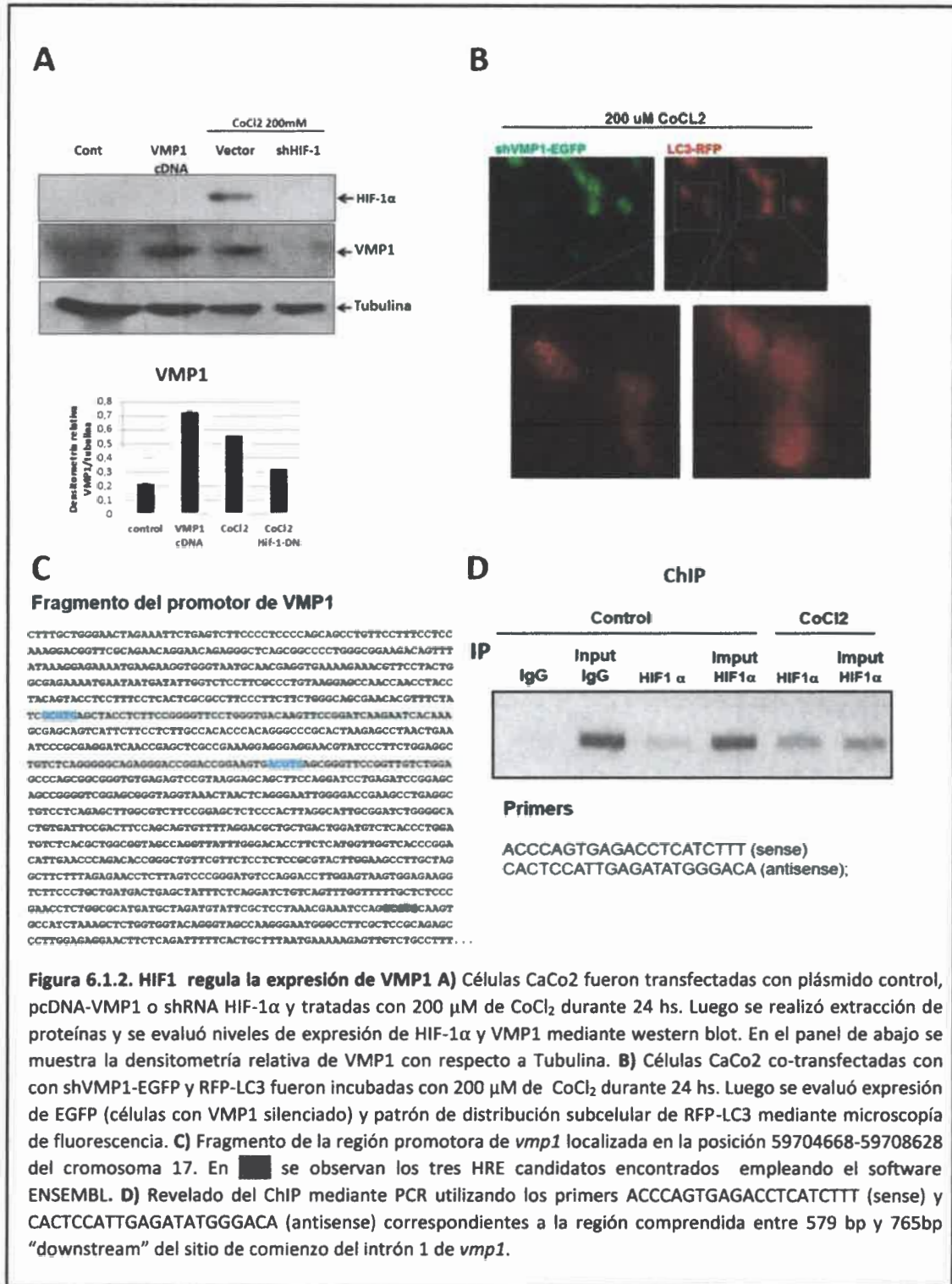


Figura 6.1.2. HIF1 regula la expresión de VMP1 A) Células CaCo2 fueron transfectadas con plásmido control, pcDNA-VMP1 o shRNA HIF-1α y tratadas con 200 μM de CoCl₂ durante 24 hs. Luego se realizó extracción de proteínas y se evaluó niveles de expresión de HIF-1α y VMP1 mediante western blot. En el panel de abajo se muestra la densitometría relativa de VMP1 con respecto a Tubulina. B) Células CaCo2 co-transfectadas con shVMP1-EGFP y RFP-LC3 fueron incubadas con 200 μM de CoCl₂ durante 24 hs. Luego se evaluó expresión de EGFP (células con VMP1 silenciado) y patrón de distribución subcelular de RFP-LC3 mediante microscopía de fluorescencia. C) Fragmento de la región promotora de *vmp1* localizada en la posición 59704668-59708628 del cromosoma 17. En **■** se observan los tres HRE candidatos encontrados empleando el software ENSEMBL. D) Revelado del ChIP mediante PCR utilizando los primers ACCCAGTGAGACCTCATCTTT (sense) y CACTCCATTGAGATATGGGACA (antisense) correspondientes a la región comprendida entre 579 bp y 765bp “downstream” del sitio de comienzo del intrón 1 de *vmp1*.

expresión de VMP1 bloquea completamente el proceso autofágico (Vaccaro et al. 2008).

Con la finalidad de determinar si la actividad del factor de transcripción HIF-1 puede modular la expresión de VMP1, células CaCo2 fueron transfectadas transitoriamente con vector control, pcDNA-VMP1 (control positivo) o shRNA HIF-1 α y tratadas con 200 μ M de CoCl₂ durante 24s. Luego se evaluó la expresión de VMP1 mediante western blot. Se observó un aumento de la expresión de VMP1 tanto en células transfectadas con pcDNA-VMP1 como las tratadas con CoCl₂. Sin embargo, en células con HIF-1 α previamente silenciado no se observó expresión significativa de la proteína autofágica demostrando que HIF-1 regula positivamente su expresión (**Fig. 6.1.2A**). Además, mediante microscopía de fluorescencia evaluamos si VMP1 es necesaria para la inducción de autofagia luego del tratamiento con CoCl₂. Células CaCo2 co-expresando shRNA-VMP1-EGFP y la proteína de fusión RFP-LC3 fueron tratadas con CoCl₂ y se evaluó el patrón de distribución de RFP-LC3 en células expresando EGFP (con silenciamiento de VMP1) vs células que expresando solamente RFP-LC3 (no silencian VMP1). La expresión de RFP-LC3 mediante transfección, produce una fluorescencia difusa en ausencia de autofagia y un patrón en puntos cuando se localiza en autofagosomas (Mizushima 2004).

Se observó que las células que **no** expresan EGFP muestran agregación de RFP-LC3 en puntos (vesículas autofágicas) con respecto a las células que expresan EGFP (y shRNA contra VMP1) donde la LC3 se observa principalmente difusa en citoplasma (**Fig.6.1.2B**). Estos resultados demuestran que en hipoxia química, VMP1 es inducida de manera dependiente de HIF-1 α y necesaria para inducción de autofagia.

Por otro lado, si bien, el mecanismo de acción de VMP1 como promotora de la formación de autofagosomas ha sido, parcialmente descrito (Molejon et al. 2013), muy poco se sabe acerca los mecanismo que regulan su expresión (Ej. a nivel transcripcional).

La respuesta molecular a la hipoxia mediada por HIF-1 consiste en el reconocimiento de una secuencia específica (A/GCGTG) o “Hypoxia Response Elements” (HRE) en la región promotora (o “Enhancers regions” o intragénica) de sus genes target. Se considera que, en general, el reconocimiento y unión a un sitio HRE por parte de HIF-1, resulta en el aumento de la transcripción del gen en cuestión (Xia et al. 2009).

Con la finalidad de determinar si VMP1 puede ser un nuevo gene target de HIF-1, evaluamos, mediante bioinformática, la presencia de secuencias HRE en su promotor. Este análisis permitió la identificación de 3 sitios HRE candidatos para HIF-1 en la posición 59704668-59708628 del cromosoma 17 del genoma humano, lo cual incluye al exón 1, intron 1 y 2800 bp 5' "upstream" de la secuencia del exón 1 (Fig. 6.1.2B). Luego evaluamos si HIF-1 es capaz de unirse al promotor de *vmp1* empleando Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP). En la Fig. 6.1.2C se observa un aumento del producto de PCR correspondiente a la región 579-765 obtenido de la inmunoprecipitación (IP) contra HIF-1 α (control) con respecto a la IP contra HIF-1 α (CoCl₂) cuando son comparados con los respectivos IP input. Esto demuestra que HIF-1 es capaz de reconocer y unirse a la región localizada entre 579bp y 765bp "downstream" del sitio de comienzo del intron 1.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que bajo condiciones de hipoxia química HIF-1 es reclutado hacia el promotor de *vmp1* e induce su expresión y de esta forma promueve la activación de la autofagia en células de cáncer de colon.

En conjunto, estos resultados demostrarían un nuevo mecanismo de regulación de la autofagia a través del factor HIF-1 modulando directamente la expresión de VMP1 y aporta nuevas evidencias que apoyan la hipótesis de que el factor HIF-1 puede comandar la autofagia promoviendo la fase de iniciación a través de la expresión de BNIP3 (BNIP3L), miRNA-210 y VMP1, todos involucrados en la estimulación de la formación del complejo PI3KIII.

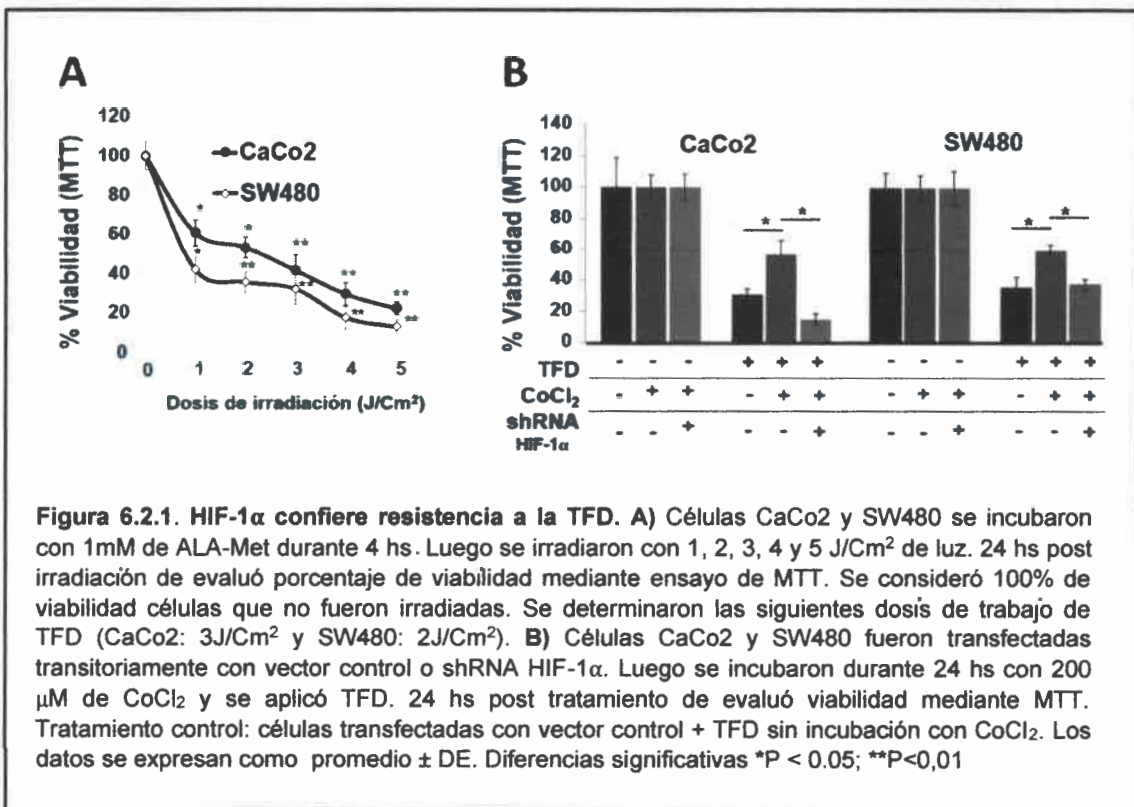
La adaptación de células tumorales a la hipoxia (mediado principalmente por HIF-1) puede tener fuertes implicancias en clínica y ha sido vinculada a la resistencia de tumores a diferentes tratamientos oncológicos. Sin embargo, cuáles son los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a tratamientos observado en estas regiones hipoxicas es una de las áreas de mayor interés en la investigación oncológica en la actualidad. En los últimos años, la autofagia también se ha convertido en unos de los principales focos de atención en la investigación contra el cáncer, y esto debido a los recientes trabajos que demuestran que la desregulación de este proceso está vinculado al desarrollo y progresión del cáncer y muchos son los reportes que concluyen que la vía autofágica no solo confiere resistencia a la muerte celular en condiciones desfavorables

propias del microambiente tumoral (Ej. Hipoxia, estrés metabólico) sino que también frente a distintos tratamientos anti-cancerígenos (Milla Sanabria et al. 2013).

En este sentido, se ha sugerido que en condiciones hipoxicas, las células tumorales son más resistentes a la terapia fotodinámica antitumoral y este fenómeno puede estar mediado por HIF-1(Wei et al. 2004). Por tal motivo, evaluamos si HIF-1 confiere resistencia a la TFD en células de cáncer de colon.

6.2. HIF-1 confiere resistencia a la TFD a través de la inducción de autofagia en células de cáncer de colon

Previamente Ji Z. y col. demostraron que el CoCl₂ induce HIF-1 α el cual a su vez confiere resistencia a la TFD/ALA. Sin embargo no se ha sugerido el mecanismo molecular implicado (Ji et al. 2006). Por esta razón evaluamos si HIF-1 inducido por CoCl₂ induce resistencia a la TFD a través de la autofagia.

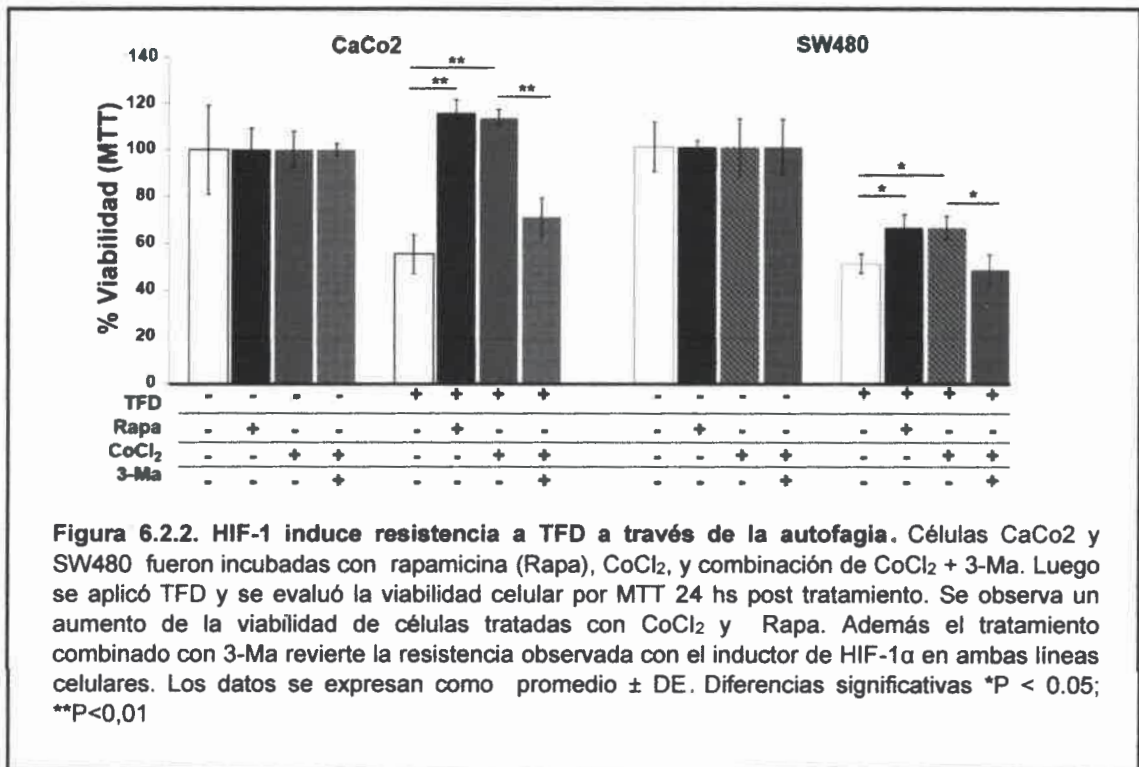


En primer lugar, determinamos la susceptibilidad de las líneas CaCo2 y SW480 a la TFD en condiciones de alta expresión de HIF-1 α así como en condiciones de HIF-1 α silenciado mediante ensayo de MTT. Como primera aproximación seleccionamos una

dosis de TFD aproximada a la LD50. Ambas líneas se incubaron con 1 mM del FS ALA-Met durante 4 hs y luego se irradiaron con distintas dosis (J/Cm²) de luz LED a 636 nm.

Como se observa en la Fig. 6.2.1A la TFD/ALA-Met indujo significativa citotoxicidad, determinada por el ensayo de MTT, de una manera dependiente de la dosis de luz en ambas líneas celulares. Seleccionamos dosis sub-letales (aprox. LD50) para cada línea (CaCo2: 3J/Cm² y SW480: 2J/Cm²).

Para evaluar el rol de HIF-1 α , células CaCo2 y SW480 se transfectaron con vector control o shRNA HIF-1 α y se incubaron con 200 μ M de CoCl₂ durante 24 hs. Luego se aplicó TFD y se determinó el porcentaje de viabilidad celular por MTT. Se observó que la inducción de HIF-1 α con CoCl₂ provocó un aumento en el porcentaje de viabilidad con respecto con tratamiento control (TFD sin CoCl₂) en ambas líneas celulares. Por el contrario, células con HIF-1 α silenciado se muestran más sensibles al tratamiento (Fig. 6.2.1B). En concordancia con evidencias previas obtenidas por otros investigadores (Ji et al. 2006)(Wei et al. 2004), nuestros resultados demuestran que HIF-1 confiere resistencia a la TFD en células de cáncer de colon.



Se ha propuesto que la inhibición de la apoptosis es uno de los mecanismos mediados

por HIF-1 (Piret et al. 2002) que podría explicar la resistencia a la TFD inducida por la hipoxia. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 4, la autofagia puede proteger a las células tumorales del efecto citotóxico mediado por la TFD, y teniendo en cuenta los resultados presentados en el apartado anterior, proponemos que HIF-1 confiere resistencia a través de la inducción de la vía autofágica.

Como el fin de poner a prueba esta hipótesis, células CaCo2 y SW480 fueron incubadas con el inductor de autofagia rapamicina, CoCl_2 o $\text{CoCl}_2+3\text{-Ma}$ (inhibidor). Posteriormente se aplicó TFD y se evaluó la viabilidad por MTT. Tanto la inducción de autofagia con rapamicina, como la inducción de HIF-1 con CoCl_2 confirieron resistencia al tratamiento fotodinámico. Sin embargo, no se observó resistencia a la TFD en células con HIF-1 α inducido, pero con bloqueo de la vía autofágica (**Fig. 6.2.2**). Estos resultados confirmarían la idea de que la autofagia es, al menos en parte, el mecanismo de resistencia inducido por HIF-1 α , ya que la inhibición de la autofagia en condiciones de hipoxia química re-sensibiliza las células el efecto fotodinámico.

El rol de la autofagia en el contexto de la TFD resulta complejo y controversial, con reportes que demuestran un papel pro-supervivencia, mientras que otros lo relacionan con un rol pro-muerte (Reiners et al. 2010). Sin embargo, los estudios sobre autofagia y TFD han sido focalizados como mecanismo inducido por la terapia más que como un mecanismo previamente activado (Ej. En respuesta a la hipoxia tumoral).

En este sentido, estudiar los mecanismos moleculares inducidos por la TFD que pueden tener un impacto sobre la respuesta tumoral al tratamiento, permitiría diseñar nuevas modalidades de tratamiento en un intento de mitigar aquellas señales inducidas que podrían provocar resistencia.

El siguiente análisis de este trabajo consistió en determinar si la TFD puede inducir autofagia en células de cáncer de colon, cuál es su rol en el contexto de la resistencia y cuál es el mecanismo molecular implicado.

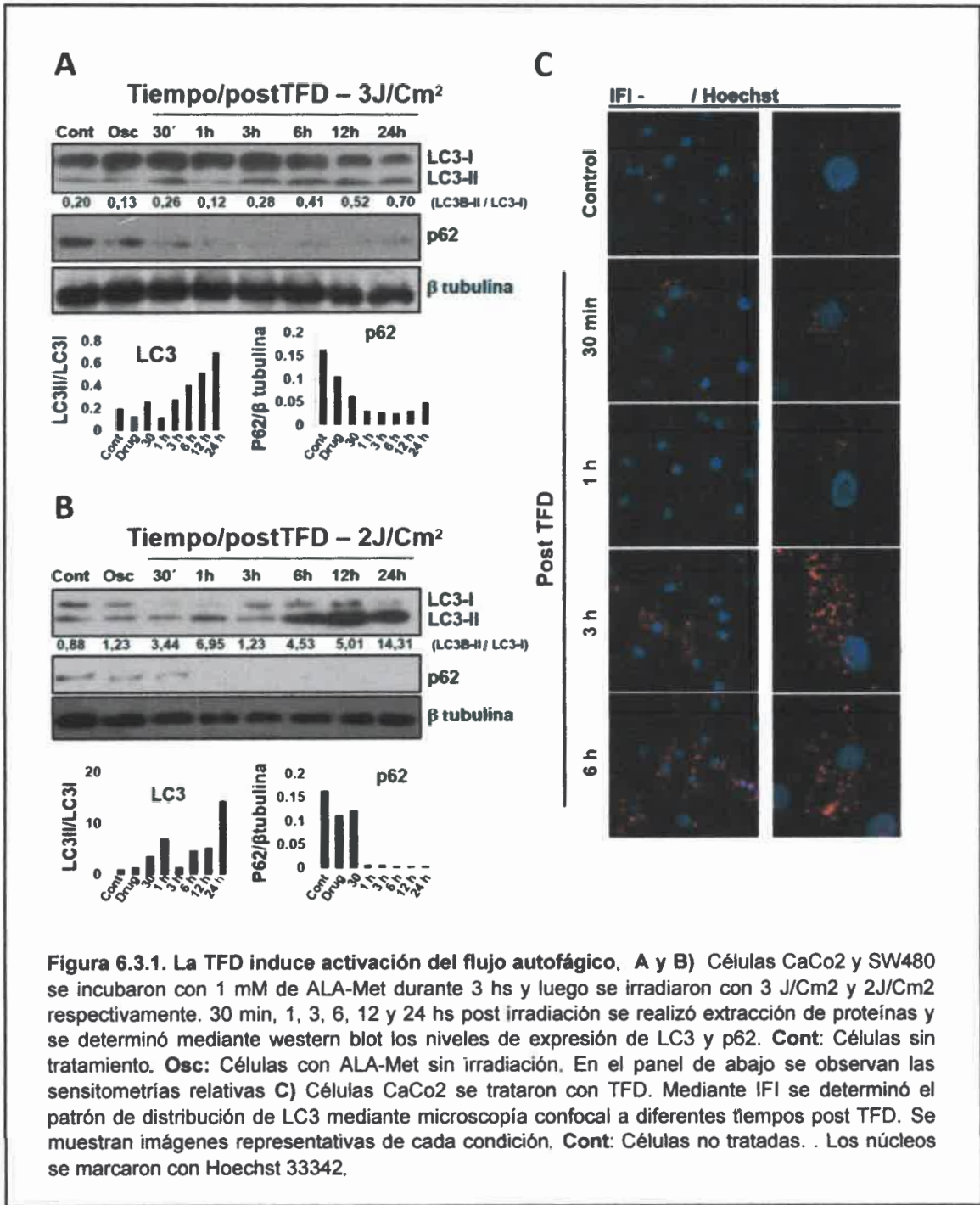


Figura 6.3.1. La TFD induce activación del flujo autofágico. A y B) Células CaCo2 y SW480 se incubaron con 1 mM de ALA-Met durante 3 hs y luego se irradiaron con 3 J/Cm² y 2J/Cm² respectivamente. 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 hs post irradiación se realizó extracción de proteínas y se determinó mediante western blot los niveles de expresión de LC3 y p62. **Cont:** Células sin tratamiento. **Osc:** Células con ALA-Met sin irradiación. En el panel de abajo se observan las sensitometrías relativas **C)** Células CaCo2 se trataron con TFD. Mediante IFI se determinó el patrón de distribución de LC3 mediante microscopía confocal a diferentes tiempos post TFD. Se muestran imágenes representativas de cada condición. **Cont:** Células no tratadas. Los núcleos se marcaron con Hoechst 33342.

6.3. La Terapia Fotodinámica empleando ALA-Met induce autofagia dependiente de HIF-1

Como se mencionó anteriormente, tanto HIF-1 como la autofagia han sido reportados como mecanismos de supervivencia (y resistencia) a la TFD (Milla Sanabria et al. 2013). La resistencia tumoral a los tratamientos anticancerígenos actuales ha sido tema

de extensos estudios en los últimos años en un intento por lograr un aumento en la eficiencia de las terapias teniendo en cuenta cuales son los mecanismo de muerte o reparación que se inducen luego de su aplicación, de esta manera se intenta generar, por ejemplo, tratamientos combinados que incluyan fármacos que inhiban las vías de supervivencia u otros que exacerben los procesos de muerte celular. La TFD así como otras terapias antitumorales, genera un efecto citotóxico dependiente de EROs, Sin embargo, se ha demostrado que diversas señales son inducidas luego del tratamiento fotodinámico, las cuales podrían ser responsables de la aparición de poblaciones celulares resistentes (Sieroñ et al. 2003; Perona & Sánchez-Pérez 2004). Los mecanismos moleculares responsables de dicho fenómeno son muy variados y han sido muy bien resumidos en el trabajo de Casas y colaboradores entre los que pueden mencionar la sobreexpresión de transportadores ABC (vinculados al flujo de FS) (Jonker et al. 2002), aumento de la capacidad de reparación del ADN (Luna & Gomer 1991), sobreexpresión de señales moleculares involucradas en la supervivencia celular tales como JUN, FOS, MYC, MAPK, NF- κ B (Ruhdorfer et al. 2007)(Luna et al. 1994)(Granville et al. 2000), señales involucradas en la inhibición de la apoptosis como aumento de los niveles de Bcl-2 (Kessel 2006) y survivina (Cogno et al. 2011), sobreexpresión de proteínas de shock térmico como HSP27, HSP60, HSP70 y HSP90 (Curry & Levy 1993) entre otros (Casas et al. 2011).

Como se mencionó en el capítulo 4, HIF-1 α es capaz de activarse en condiciones de hipoxia (Semenza 2004), así como en altos niveles de EROs (Bell & Chandel 2007). En este sentido, la TFD es capaz de provocar un consumo fotoquímico del oxígeno, así como altos niveles de EROs a nivel intracelular, por lo tanto, cabe esperar que luego del tratamiento fotodinámico se observe un aumento de la actividad de HIF-1. Por otro lado, la vía autofágica parece ser una respuesta celular común inducida luego de la TFD con diferentes dosis y FSs (Reiners et al. 2010), aunque su rol como pro-supervivencia o pro-muerte sigue siendo tema de estudio y discusión en la actualidad. Sin embargo, aún no hay reportes que determinen cual es el mecanismo molecular mediante el cual la autofagia se induce luego de la TFD. Teniendo en cuenta los resultados mostrados en el apartado anterior, nos preguntamos si la TFD induce autofagia a través de la inducción de HIF-1.

6.3.1. La TFD/ALA-Met induce autofagia en células de cáncer de colon

Con la finalidad de evaluar activación de la vía autofágica en respuesta a la TFD empleando ALA-Met, se aplicó terapia fotodinámica y se evaluó la activación de flujo autofágico mediante western blot y microscopia confocal.

Células CaCo2 y SW480 se trataron con TFD y a distintos tiempos post tratamiento se realizó extracción de proteínas y se determinó el nivel de expresión LC3 y p62.

En la **Figura 6.3.1(A y B)** se puede observar que luego de la TFD hubo un incremento en la relación LC3II/LC3I en CaCo2 y SW480 a partir de 3 h y 30min respectivamente. La proteína p62 es un marcador de carga a ser degradados por autofagia, la fusión de autofagosomas con lisosomas degrada los componentes capturados junto con p62. Observamos una correlación entre el aumento del procesamiento de LC-3 y una disminución de los niveles de p62 indicando flujo autofágico activo.

Además, se observó que luego del tratamiento fotodinámico, GFP-LC3 se agrega en puntos con respecto a los controles donde se observa difusa en citoplasma (**Fig. 6.3.1C**) Estos resultados demuestran que la TFD induce autofagia en células de cáncer de colon.

6.3.2. La autofagia confiere resistencia a la TFD/ALA-Met

Como se describe a continuación, se evaluó el rol de la autofagia en respuesta a la TFD. Células CaCo2 y SW480 fueron incubadas con diferentes inductores e inhibidores de autofagia. La función de los activadores e inhibidores utilizados se resume en la **Tabla 2**. Para determinar las condiciones de tratamiento, las células fueron pre-tratadas con los diferentes fármacos y posteriormente se evaluó el procesamiento de LC3 post TFD. En la **Figura 6.3.2.1A** se observa el diseño del experimento. En la **Fig. 6.3.2.1B**, se muestra que tanto la Wortmanina como a 3-Metiladenina bloquearon el procesamiento de LC3 inducido por la TFD, por el contrario, se observó acumulación de LC3-II en células tratadas con Cloroquina.

Posteriormente, mediante MTT se evaluó la viabilidad post TFD de células CaCo2 y SW480 pre-tratadas con WM, 3-Ma y CQ. Se observó que todos los inhibidores

utilizados sensibilizaron ambas líneas celulares al afecto fotodinámico (Fig. 6.3.2.2AyB).

En conjunto, estos resultados indican que **la autofagia es un mecanismo de supervivencia inducido por la TFD/ALA-Met en células de cáncer de colon.**

Tabla 2. Resumen de los activadores e inhibidores utilizados, Nombre, función y concentración de trabajo.

Nombre	Función	Conc. trabajo
Earle's balanced salts solution (Stv)	Inducción de autofagia por escasez de aminoácidos (Medio de ayuno)	1X
Rapamicina (Rapa)	Inductor de autofagia. Se une e inhibe la actividad de mTOR (inhibidor de autofagia) mimetizando una situación de escases de nutrientes.	100 nM
Wortmanina (WM)	Inhibidor de autofagia. Inhibe la actividad de PI3K.	10 uM
3-Metiladenina (3-Ma)	Inhibidor de autofagia. Bloquea la formación de los autofagosomas por inhibición de PI3K III.	10 mM
Cloroquina (CQ)	Inhibidor de flujo autofágico. Inhibe acidificación de lisosomas, bloqueando la fusión de autofagosomas y lisosomas y actividad de enzimas lisosomales.	10 uM

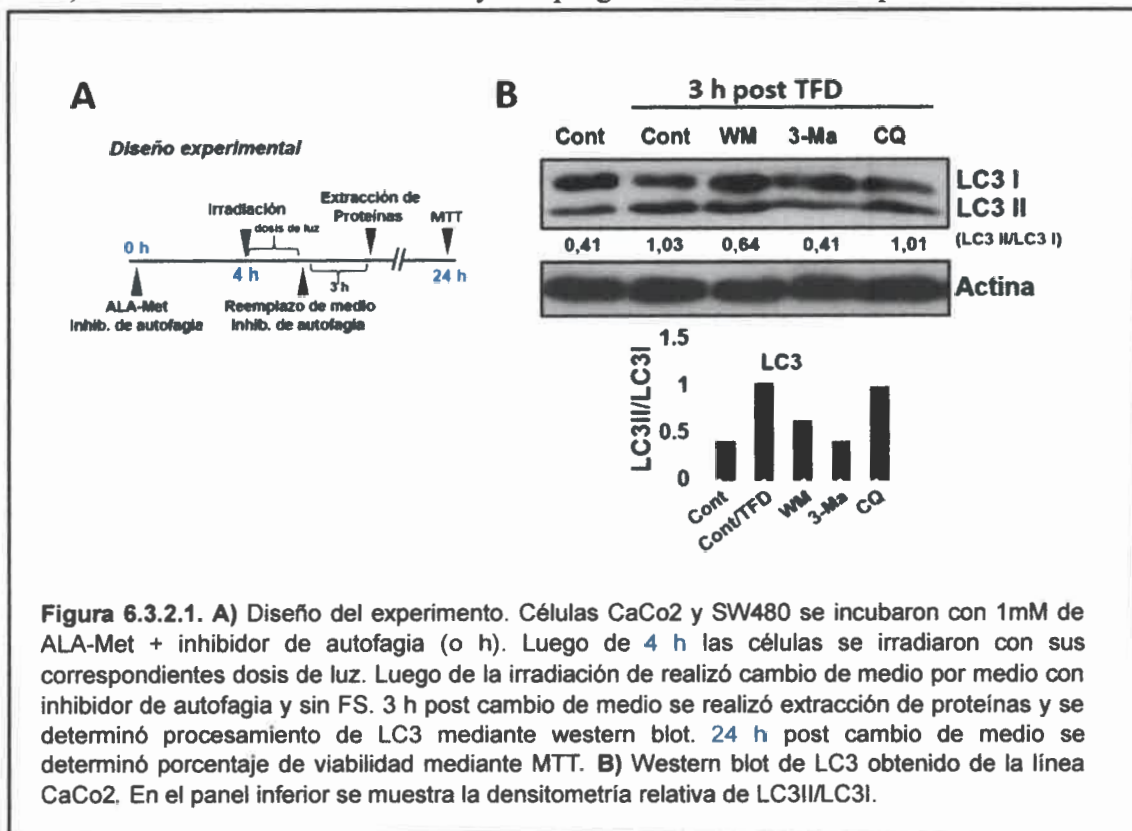
Nuestros resultados concuerdan con observaciones realizadas por otros investigadores que demostraron que el bloqueo de la autofagia (por ejemplo mediante silenciamiento de Atg7) resulta en la fotosensibilización de células tumorales (Davids et al. 2009; Reiners et al. 2010)

Sin embargo, diversos estudios examinando el rol de la autofagia en cáncer indican que este proceso puede tener una función pro-muerte o pro-supervivencia dependiendo del contexto (Apel, et al., 2008). En este sentido, algunos autores han reportado que la autofagia puede ser iniciada como un mecanismo de muerte celular, por ejemplo, en células HeLa tratadas con TFD/RBAC (Panzarini et al. 2011). Otros autores, por el

contrario, demostraron que la TFD/Verteoporfina induce tanto apoptosis como autofagia en células leucémicas 1c1c7, con la autofagia protegiendo del fotodaño en células apoptosis-competentes (Andrzejak et al. 2011). En síntesis, el rol la autofagia luego del tratamiento fotodinámico puede diferir marcadamente entre distintos tipos celulares, dependiendo de una variedad de características, incluyendo su capacidad de sufrir apoptosis, dosis de tratamiento, tipo de FS, localización intracelular del FS, potencial metabólico o el grado de fotodaño (Dini et al. 2010)(Milla Sanabria et al. 2013).

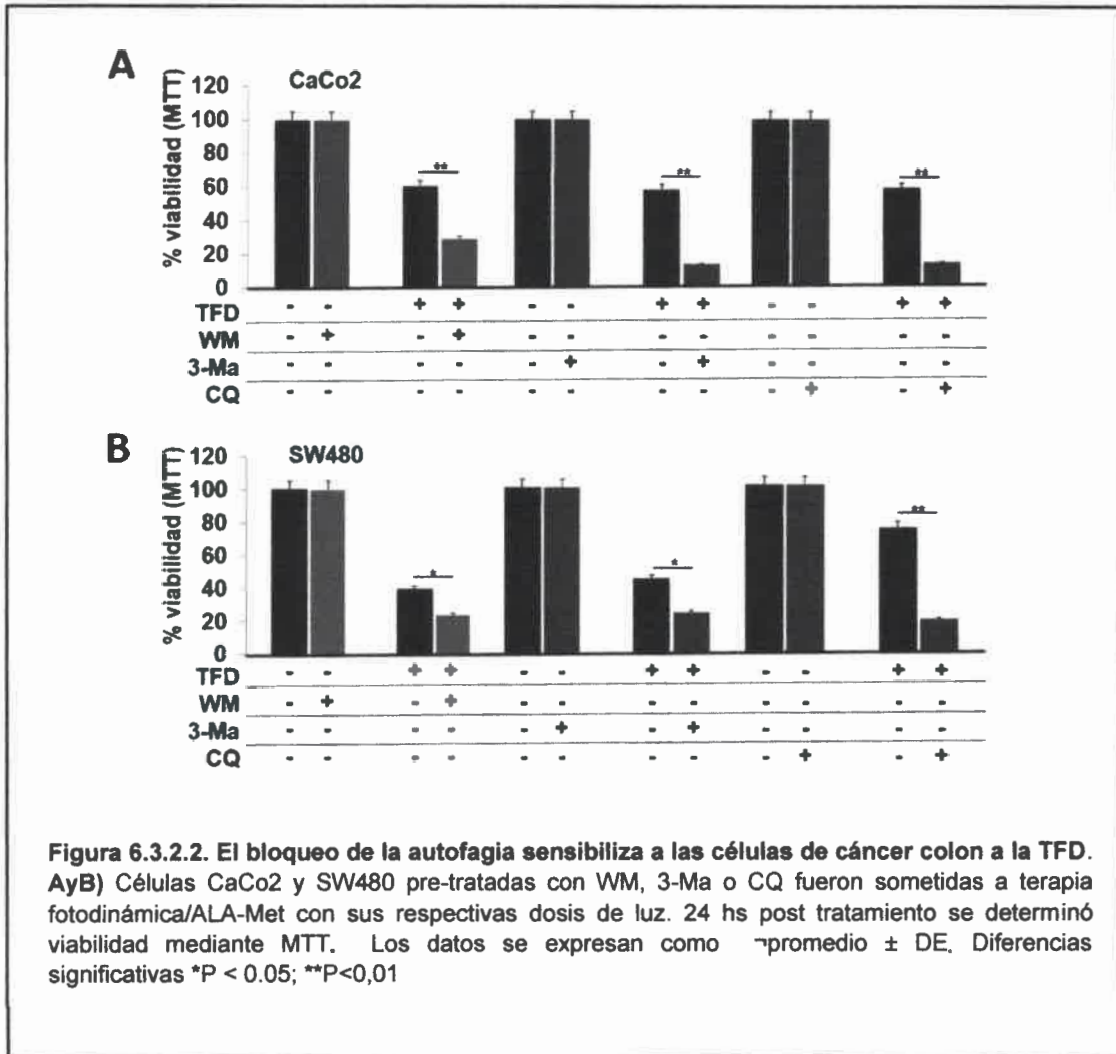
El rol de la autofagia en respuesta a la terapia fotodinámica es compleja y parece claro que las EROs producidos por el tratamiento podrían ser los principales responsables de conducir su activación (Scherz-Shouval, Shvets, Fass, et al. 2007).

La primera línea de defensa contra EROs puede ser rápidamente sobrepasada durante la TFD, llevando a un estrés oxidativo y una progresiva falla de la maquinaria celular.



En células de mamíferos, el sistema lisosomal autofágico representa el principal sistema proteolítico de limpieza (degradación) de organelas dañadas por EROs y proteínas citosólicas oxidadas irreversiblemente (Nyström 2005). Es posible que la autofagia sea iniciada en un intento por remover organelas fotodañadas y agregados de

proteínas que no pueden ser removidos por el sistema ubiquitina-proteosoma, y de esta forma reduce el daño intracelular promoviendo supervivencia (Dewaele et al. 2011a). Las evidencias que apoyan el rol de las EROs como moduladoras de autofagia durante la TFD se basan en trabajos que demuestran que el tratamiento con antioxidantes revierten, parcial o totalmente, la activación del proceso autofágico (Dewaele et al. 2011b), sin embargo aún conocemos muy poco acerca de cómo las Especies Reactivas de Oxígeno pueden interactuar con la maquinaria autofágica. En este sentido, Scherz-Shouval y colaboradores evidenciaron que la oxidación (mediada por H₂O₂) de ATG4, inhibe su capacidad de hidrolizar (y “delipidar”) LC3 permitiendo la correcta elongación de los autofagosomas (Scherz-Shouval, Shvets & Elazar 2007). Por otro lado, otros autores demostraron que el H₂O₂ puede promover la inducción de la vía autofágica a través de la señalización dependiente de JNK (Zhang et al. 2013). Si bien en este trabajo no nos focalizaremos en el rol de EROs como moduladores de autofagia inducida por TFD/ALA-Met, es de destacar que en los últimos años diferentes trabajos demostraron que HIF-1 α puede ser estabilizado y activado en condiciones de estrés oxidativo (Chua et al. 2010)(Jung et al. 2008)(Bonello et al. 2007). **Sin embargo, no hay reportes que vinculen si la activación de la autofagia en respuesta a la TFD está mediada por HIF-1 (posiblemente estabilizado y activado por EROs).** Por tal motivo, proponemos la hipótesis de que la TFD induce autofagia a través de la inducción de HIF-1 α .



6.3.3. La TFD induce autofagia dependiente de HIF-1 α y VMP1

Considerando los resultados presentados hasta el momento, se consideró de interés la evaluación del rol de la vía HIF-1/VMP1 previamente descrita como posible regulador de la autofagia inducida por la TFD. Mediante western blot se evaluó e nivel de expresión de HIF-1 α a diferentes tiempos post TFD. Se observó un aumento transitorio del nivel de expresión de HIF-1a post tratamiento (**Fig. 6.3.3.1A**). Con la finalidad de evaluar si HIF-1 α puede modular la autofagia inducida por la TFD. Células CaCo2 se transfectaron con shRNA HIF-1 α , y mediante western blot se determinó la relación LC3-II/LC3I luego del tratamiento fotodinámico. Resulta interesante que el knockdown de HIF-1 α disminuyo el procesamiento de LC3 luego de la TFD (**Fig. 6.3.3.1B**). Según nuestra extensa búsqueda bibliográfica, **este es el primer reporte que demuestra que**

la autofagia inducida por la TFD depende, al menos en parte, del Factor Inducible por Hipoxia.

Según los antecedentes bibliográficos, podemos pensar que activación de HIF-1 α luego de la TFD se debe a dos fenómenos accionando en conjunto: 1- el consumo fotoquímico de oxígeno y 2- un aumento en los niveles de EROs los cuales podrían actuar como moléculas señal “upstream” de HIF-1 α tales como la inhibición de hidroxilasas y fosfatasas (Ferrario et al. 2000)(Mitra et al. 2006)(Jung et al. 2008). En consecuencia, según nuestros resultados, HIF-1 se activa, promueve autofagia e induce resistencia al tratamiento.

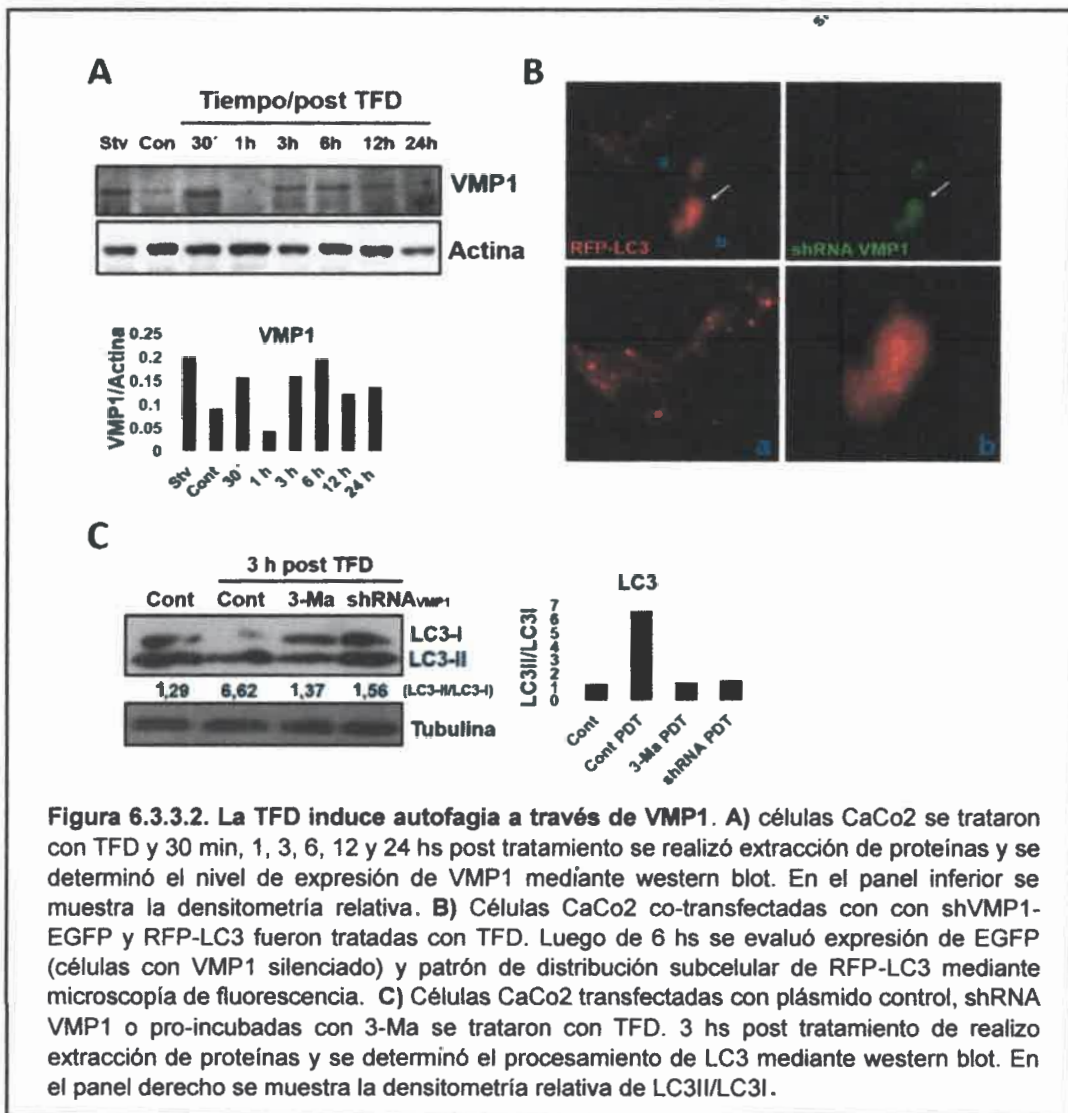
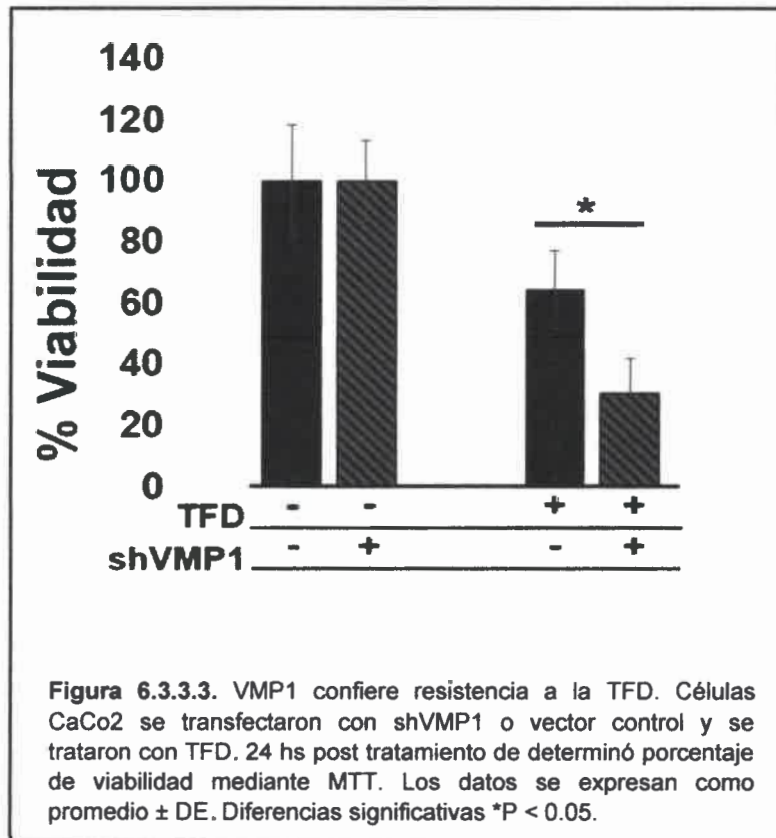


Figura 6.3.3.2. La TFD induce autofagia a través de VMP1. A) células CaCo2 se trataron con TFD y 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 hs post tratamiento se realizó extracción de proteínas y se determinó el nivel de expresión de VMP1 mediante western blot. En el panel inferior se muestra la densitometría relativa. B) Células CaCo2 co-transfectadas con con shVMP1-EGFP y RFP-LC3 fueron tratadas con TFD. Luego de 6 hs se evaluó expresión de EGFP (células con VMP1 silenciado) y patrón de distribución subcelular de RFP-LC3 mediante microscopía de fluorescencia. C) Células CaCo2 transfectadas con plásmido control, shRNA VMP1 o pro-incubadas con 3-Ma se trataron con TFD. 3 hs post tratamiento de realizo extracción de proteínas y se determinó el procesamiento de LC3 mediante western blot. En el panel derecho se muestra la densitometría relativa de LC3II/LC3I.

Por otro lado, la TFD también induce un aumento transitorio de los niveles de expresión de VMP1 (Figura 6.3.3.2A), lo que sugiere que el eje HIF-1/VMP1 es necesario para la

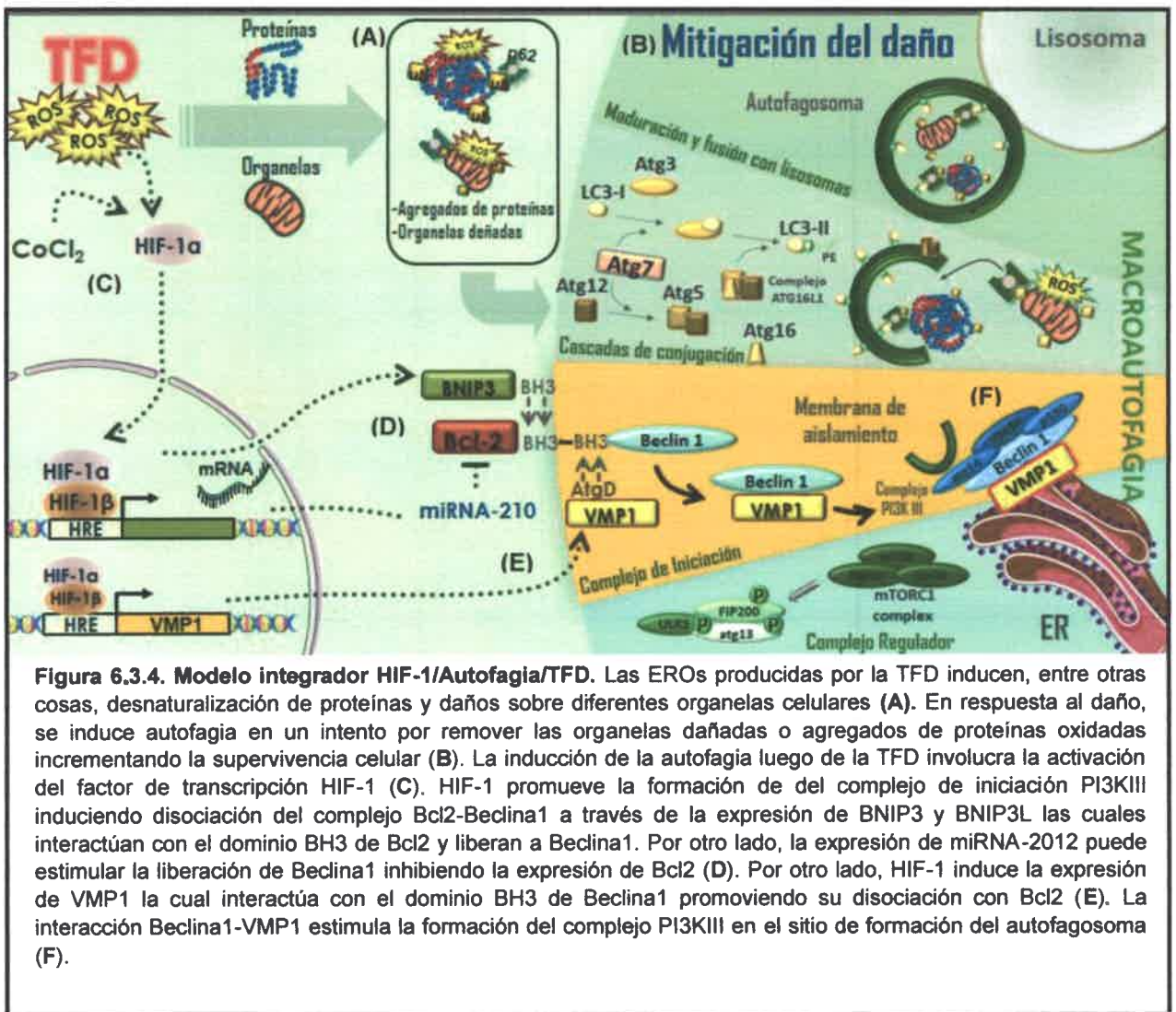
activación de la autofagia post TFD. Además, el bloqueo de la expresión de la proteína autofágica mediante shRNA bloqueó el procesamiento de LC3 luego de la TFD, de forma comparable a lo observado con el inhibidor 3-Ma (Figura 6.3.3.2.B) y RFP-LC3 se observó difusa en células expresando shVMP1-EGFP comparadas con las que expresaron solamente RFP-LC3 luego de la terapia (Fig.6.3.3.1C), confirmando, en parte, el rol de HIF-1/VMP1 como mediador de autofagia en respuesta al tratamiento. Por último, evaluamos si el bloqueo de la autofagia mediante el silenciamiento de VMP1 sensibiliza células de cáncer de colon al afecto de la terapia fotodinámica. Como se puede observar en la (Fig. 6.3.3.3) el silenciamiento de VMP1 disminuyó el porcentaje de viabilidad luego de la TFD con respecto al tratamiento control. Estos resultados demuestran que la autofagia dependiente de VMP1 inducida por la TFD confiere resistencia a la muerte celular.



El rol de VMP1 como modulador de muerte celular es controversial y puede depender del tipo y estadio tumoral. Reportes de Vaccaro y colaboradores, han demostrado que la sobreexpresión de VMP1 induce autofagia y promueve muerte celular apoptótica en

células de cáncer de páncreas PANC-1 y MIAPaCa-2 (Pardo et al. 2010). Por otro lado se ha demostrado que existe una correlación entre una menor expresión de VMP1 en tejido tumoral y un pronóstico desfavorable tanto en tumores hepatocelulares como en cáncer de colon (Guo et al. 2012)(Guo et al. 2015) sugiriendo que VMP1 puede actuar como un supresor tumoral. Sin embargo, no está claro su rol de VMP1 como supresor de tumor involucra su capacidad de modular la vía autofágica. Por el contrario, en este trabajo, demostramos que VMP1 puede conferir resistencia a la muerte celular luego de la TFD, a través de la inducción de autofagia en células de cáncer de colon. Nuestros resultados son consistentes con observaciones realizadas por otros investigadores quienes demostraron que, contrariamente a lo observado en células pancreáticas, en células de cáncer de colon SW480 la autofagia dependiente de VMP1 es un mecanismo que promueve supervivencia e inhibe apoptosis en condiciones de estrés nutricional (Qian et al. 2014).

Con los resultados obtenidos hasta el momento, proponemos un nuevo modelo integrador de regulación de la autofagia a través de HIF-1 enfatizando el papel del factor de transcripción inducible por hipoxia en la regulación de la formación de los autofagosomas, promoviendo la formación del complejo Vps34-Beclina-1-VMP1, ya sea 1- induciendo la transcripción de BNIP3 (y BNIP3L) a través del reconocimiento de HREs en sus promotores, los cuales a su vez liberan Beclina1 2- la inducción de miRNA-210 (directa o indirectamente) el cual a su vez promueve la degradación del mRNA de Bcl-2 (inhibidor de Beclina1), o 3- la inducción de la expresión de VMP1, directamente a través del reconocimiento de HREs en su promotor. Como consecuencia, la inducción de la autofagia permitiría mitigar el daño intracelular inducido por la TFD y promover supervivencia (Figura 6.3.4).



Si bien no fue objetivo de este trabajo evaluar que vías de muerte celular pueden ser inducidas luego de la aplicación de TFD/ALA-Met (Mroz et al. 2011)(Yoo & Ha 2012), muchos reportes han demostrado que la activación de la autofagia puede tener como consecuencia la inhibición de la apoptosis (Bincoletto et al. 2013)(Zhou et al. 2014). Y este es otro de los mecanismos que podrían explicar el aumento de la resistencia observado en células con autofagia inducida.

6.4. El microambiente tumoral: un nuevo paradigma

Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran que la TFD es capaz de inducir HIF-1/autofagia como mecanismos de resistencia. Además, demostramos que la inducción de HIF-1 α , previo al tratamiento fotodinámico, provoca la activación de la autofagia y este mecanismo permite la supervivencia celular luego de la TFD. Estos resultados, nos permiten plantear la hipótesis de que en tumores sólidos, la autofagia se activa en las regiones hipóxicas, de una manera dependiente de HIF-1 y en consecuencia estas regiones serán resistentes al efecto fototóxico. Si bien se ha demostrado que los autofagosomas son comunes en células localizadas en las regiones hipóxicas del tumor, y además, la delección de genes autofágicos esenciales resulta en la muerte específicamente de células en hipoxia, estas regiones se caracterizan por tener una disminuida disponibilidad de oxígeno y nutrientes (Ej. aminoácidos, glucosa, entre otros), los cuales podrían comandar la activación de la autofagia de una manera independiente de HIF-1 (Karantza-Wadsworth et al. 2007; Mathew, Kongara, et al. 2007; Degenhardt et al. 2006). La autofagia se activa en respuesta a estrés metabólico, permitiendo la obtención de nuevos metabolitos a través de la degradación y reciclado de componentes intracelulares que facilitan la supervivencia de las células tumorales durante la escasez de nutrientes y está regulada principalmente por la vía de PI-3Kinasas/AKT - mTOR (“Downstream” AKT) - AMPK (Inhibe mTOR) las cuales regulan el crecimiento celular y síntesis de proteínas en respuesta a factores de crecimiento, disponibilidad de nutrientes (Ej. aminoácidos) y niveles de ATP/AMP (Mizushima 2007)(Degenhardt et al. 2006)(Karantza-Wadsworth et al. 2007)(Mathew, Karantza-Wadsworth, et al. 2007). En este sentido, la autofagia puede ser suprimida cuando las condiciones nutricionales son favorables para sostener el metabolismo celular (Yue et al. 2003)(Liang et al. 1999). En síntesis, los tumores sólidos plantean un escenario complejo en donde diferentes vías metabólicas pueden actuar en concierto regulando un mismo evento celular: La Autofagia. En este contexto, cabe preguntarnos cuál es el rol de la autofagia dependiente de HIF-1 en un microambiente estresante (hipoxia y estrés metabólico).

Surge entonces la necesidad de emplear sistemas de cultivos, simples y reproducibles que intenten recrear el microambiente tumoral y permitan identificar y analizar nuevas

variables químicas, físicas y mecánicas que resultan de la arquitectura tridimensional de los tumores sólidos, así como, simular y estudiar el impacto de la presencia de regiones hipóxicas (y con estrés nutricional) sobre los tratamientos antitumorales.

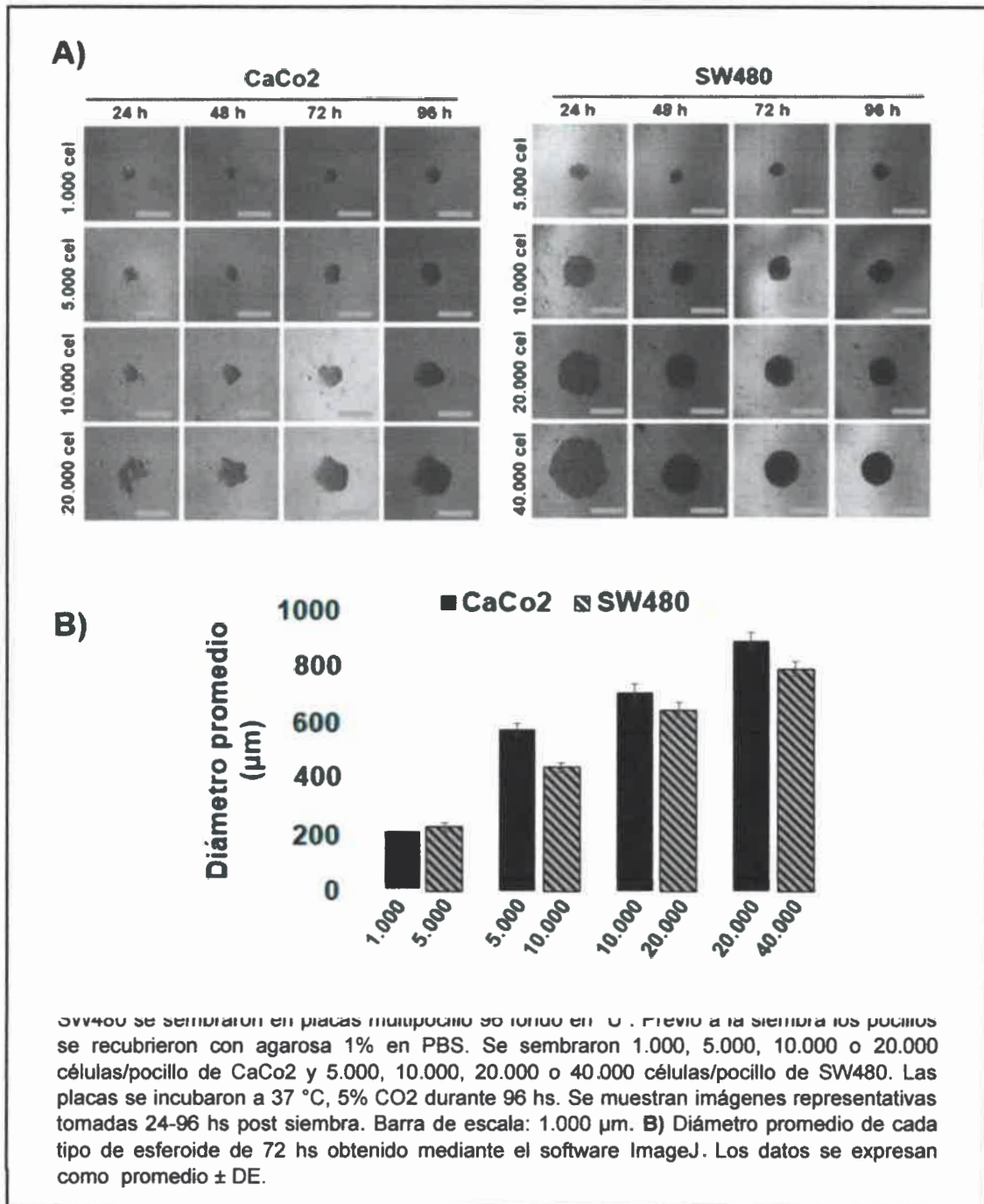
6.4.1. Generación de cultivos tridimensionales

Evidencias recientes demuestran que cambios en la dimensionalidad tisular alteran las propiedades mecánicas de la matriz extracelular (MEC), gradientes de oxígeno y estímulos físicos exógenos que pueden participar en la iniciación y progresión del cáncer (Infanger et al. 2013). En los últimos años, los sistemas de cultivo en tres dimensiones han ganado el reconocimiento como una herramienta efectiva para la investigación en cáncer. Los cultivos 3D mimetizan de manera más precisa el microambiente fisiológico de los tejidos, comparado a los sistemas de cultivo en monocapa. Los esferoides tumorales son uno de los clásicos modelos 3D empleados en el estudio de tratamientos antitumorales. Debido que imitan las interacciones 3D de célula-matriz y célula-célula, los esferoides tumorales reestablecen muchos aspectos del microambiente pato-fisiológico dentro del tejido tumoral (Ma et al. 2012) y pueden considerarse como un modelo intermedio entre el sistema convencional de cultivo en monocapa y los modelos *in vivo* (Santini & Rainaldi 1999).

La presencia de regiones hipoxias ha sido ampliamente documentada en los cultivos tridimensionales (E et al. 2006)(Ohnishi et al. 2014). Se ha propuesto que la activación de HIF-1 puede deberse tanto a la limitada difusión de oxígeno, así como a la limitada penetración de nutrientes que provoca un aumento del estrés metabólico, que consecuentemente induce la producción de EROs que, como se mencionó anteriormente, pueden modular la activación de HIF-1 (Capítulo 4).

Por tal motivo, evaluamos si la autofagia puede ser activada en este microambiente estresante de forma dependiente de HIF-1 α , y cuál es su impacto sobre la respuesta a la TFD. En primera instancia determinamos si las líneas celulares CaCo2 y SW480 generan esferoides tumorales empleando el método “Liquid-overlay”. Según Carlsson y colaboradores, el empleo de este método consiste en cultivar las células sobre un pocillo (Ej. placas p96-fondo U) recubierto con una superficie no adherente, por ejemplo, agarosa (Carlsson & Yuhas 1984). Las células no se adhieren al sustrato y forman

agregados celulares que se vuelven redondeados y pueden ser más o menos compactos y con bordes más o menos regulares dependiendo del tipo celular (Carlsson & Yuhas 1984).



Se sembraron 1.000, 5.000, 10.000 y 20.000 células/pocillo de CaCo2 y 5.000, 10.000, 20.000 y 40.000 células/pocillo de SW480 en placas multipocillo de 96 con fondo en "U", previamente recubiertas con agarosa 1%. Las placas se incubaron durante 24-96 hs

en condiciones de cultivo convencionales. Fotografías representativas de los esferoides de ambas líneas celulares se muestran en la **Fig. 6.4.1A**. Se determinó que los esferoides se forman a las 72 hs post siembra con diámetro promedio de 200-800 μm (**Fig. 6.4.1B**).

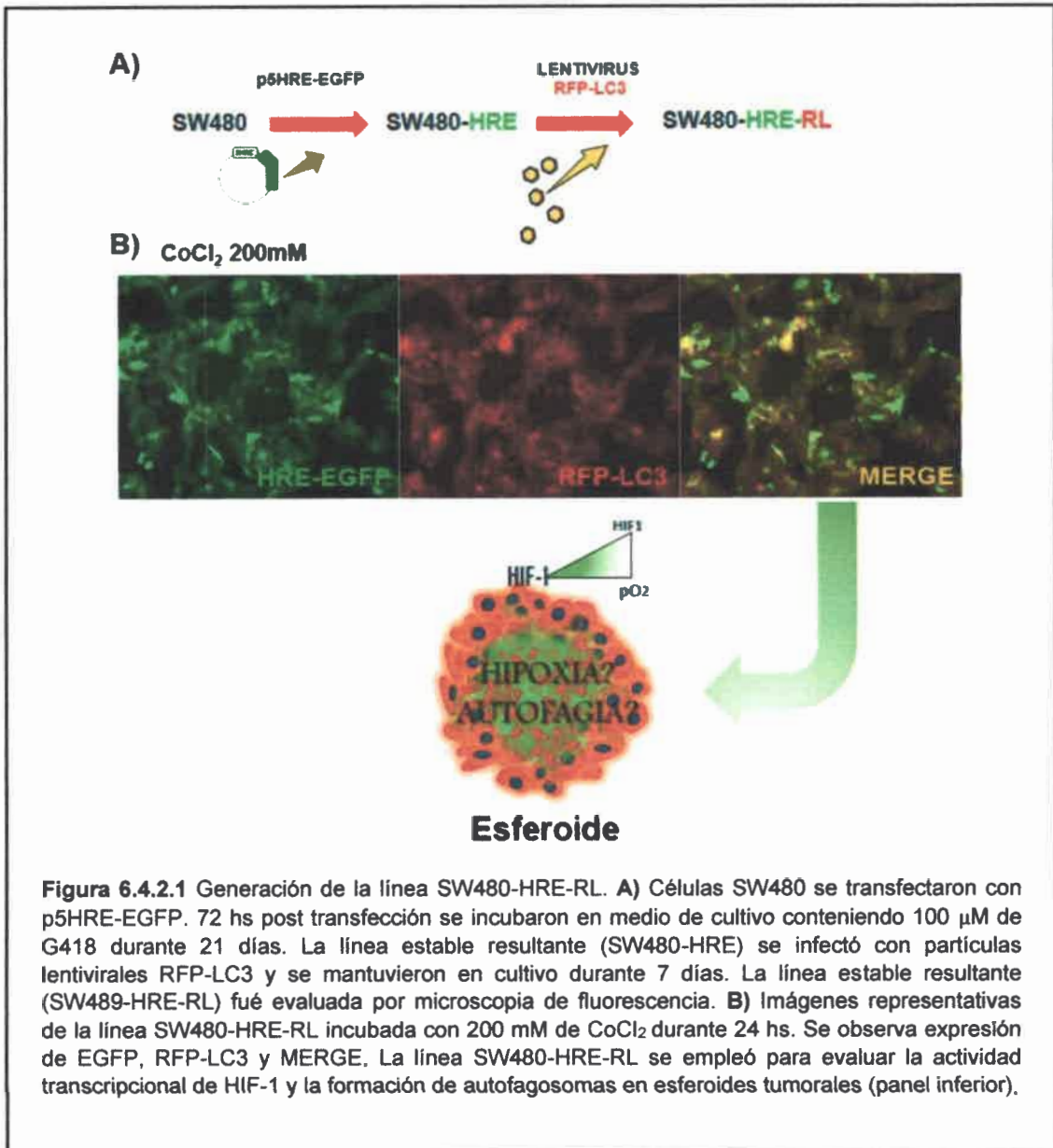
6.4.2. Los cultivos tridimensionales inducen actividad de HIF-1

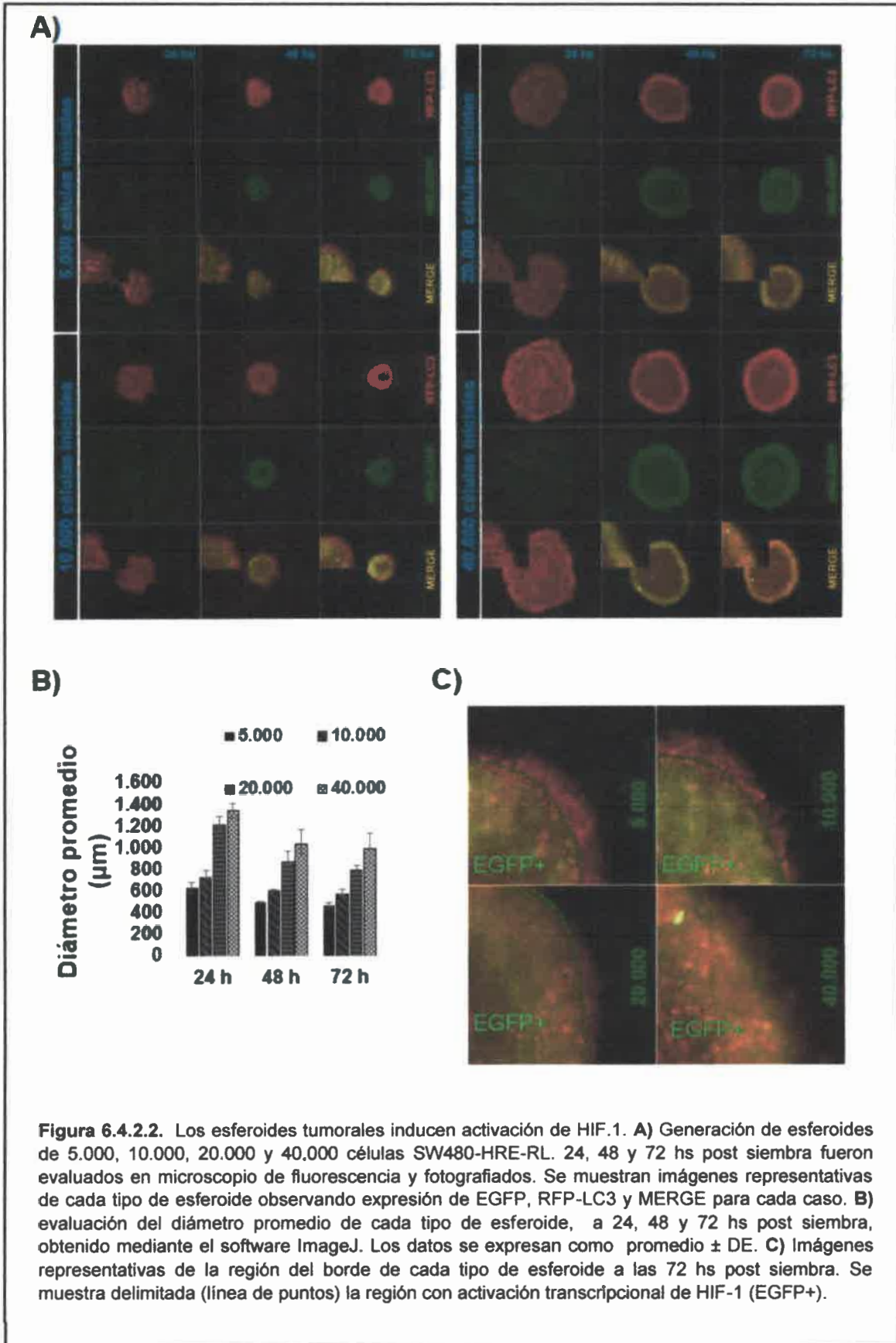
Con la finalidad de determinar si los esferoides tumorales inducen activación de HIF-1, células SW480 fueron transfectadas con p5HRE-EGFP. 72 hs post transfección las células se incubaron con geneticina (G418) durante 21 días con la finalidad de seleccionar una población estable. Posteriormente, la línea SW480-HRE se incubó con CoCl₂ para confirmar la expresión de EGFP.

Como se observa en la **Fig. 6.4.2.1B** aproximadamente un 90% de las células SW480-HRE expresan EGFP bajo condiciones de hipoxia química, confirmando la generación de la línea estable. Luego, empleando un sistema lentiviral de tercera generación se produjeron partículas lentivirales conteniendo el constructo RFP-LC3 (Lu et al. 2013). Células SW480-HRE fueron infectadas con partículas RFP-LC3. 72 hs post infección, realizamos cambio de medio y las células se mantuvieron en cultivo durante 7 días. Posteriormente evaluamos la expresión de la proteína de fusión mediante microscopía de fluorescencia. La infección de células SW480-HRE con partículas RFP-LC3, permitió la generación de la línea SW480-HRE-RL la cual expresa de forma estable EGFP bajo control de promotor inducible por HIF-1 y la proteína de fusión RFP-LC3 reportera de autofagia **Fig. 6.4.2.1B**.

Con la finalidad de evaluar la presencia de regiones hipóxicas (con actividad de HIF-1), se generaron esferoides de SW480-HRE-RL de 5.000, 10.000, 20.000 y 40.000 células iniciales y se fotografiaron a 24-72 hs de formación, mediante microscopía de fluorescencia. En la **Fig. 6.4.2.2A** se muestran imágenes representativas de cada una de las condiciones mencionadas. Se observó en todos los casos que la expresión de EGFP fue detectada a partir de las 48 hs de incubación. Esto puede deberse, a que durante las primeras 24 hs post siembra, los esferoides no son lo suficientemente compactos como para generar un gradiente de difusión de oxígeno y nutrientes, este hecho se apoya en la observación de que a mayor tiempo de incubación, disminuye el diámetro inicial de los

esferoides, sugiriendo mayor compactación de los mismos (**Fig. 6.4.2.2B**). Por otro lado, determinamos que a las 24 y 48 hs post siembra, estos no son lo suficientemente compactos y estables, lo que dificulta su manipulación y extracción del pocillo de formación. Por esta razón, continuamos nuestros experimentos empleando esferoides de 72 hs.





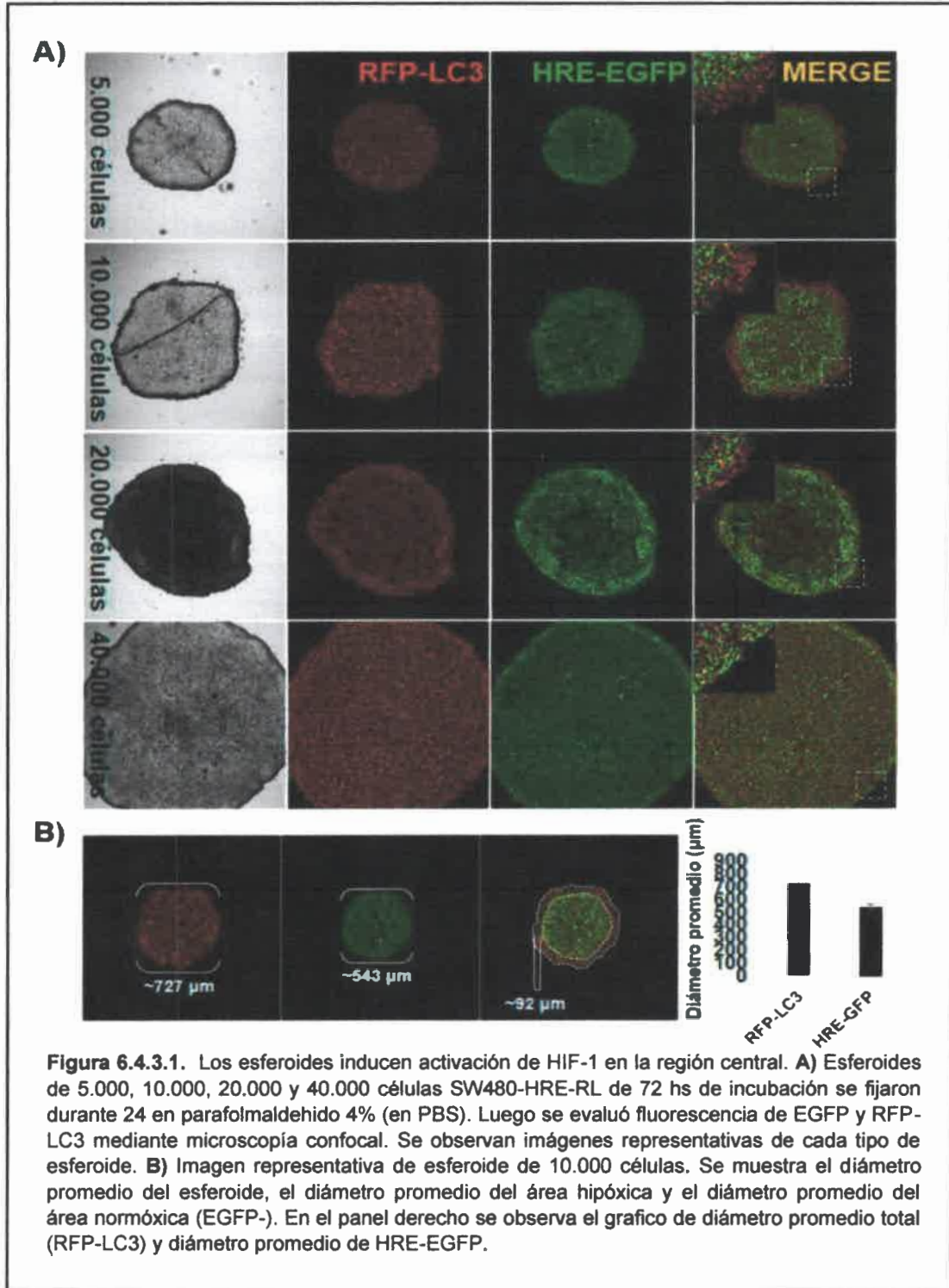
En la **Fig.6.4.2.2C** se observa una amplificación del borde de esferoides de 72 hs y de diferentes tamaños. Se observó que en los esferoides de 5.000 y 10.000 células iniciales se puede distinguir una región con actividad transcripcional de HIF-1 (EGFP+) y una región sin activación del factor (EGFP-). Estos resultados demuestran que los cultivos tridimensionales de células de cáncer de colon recrean la presencia de regiones hipóxicas (con activación del factor de transcripción HIF-1) propias de los tumores sólidos.

6.4.3. Los cultivos tridimensionales inducen flujo autofágico en sitios con actividad transcripcional de HIF-1

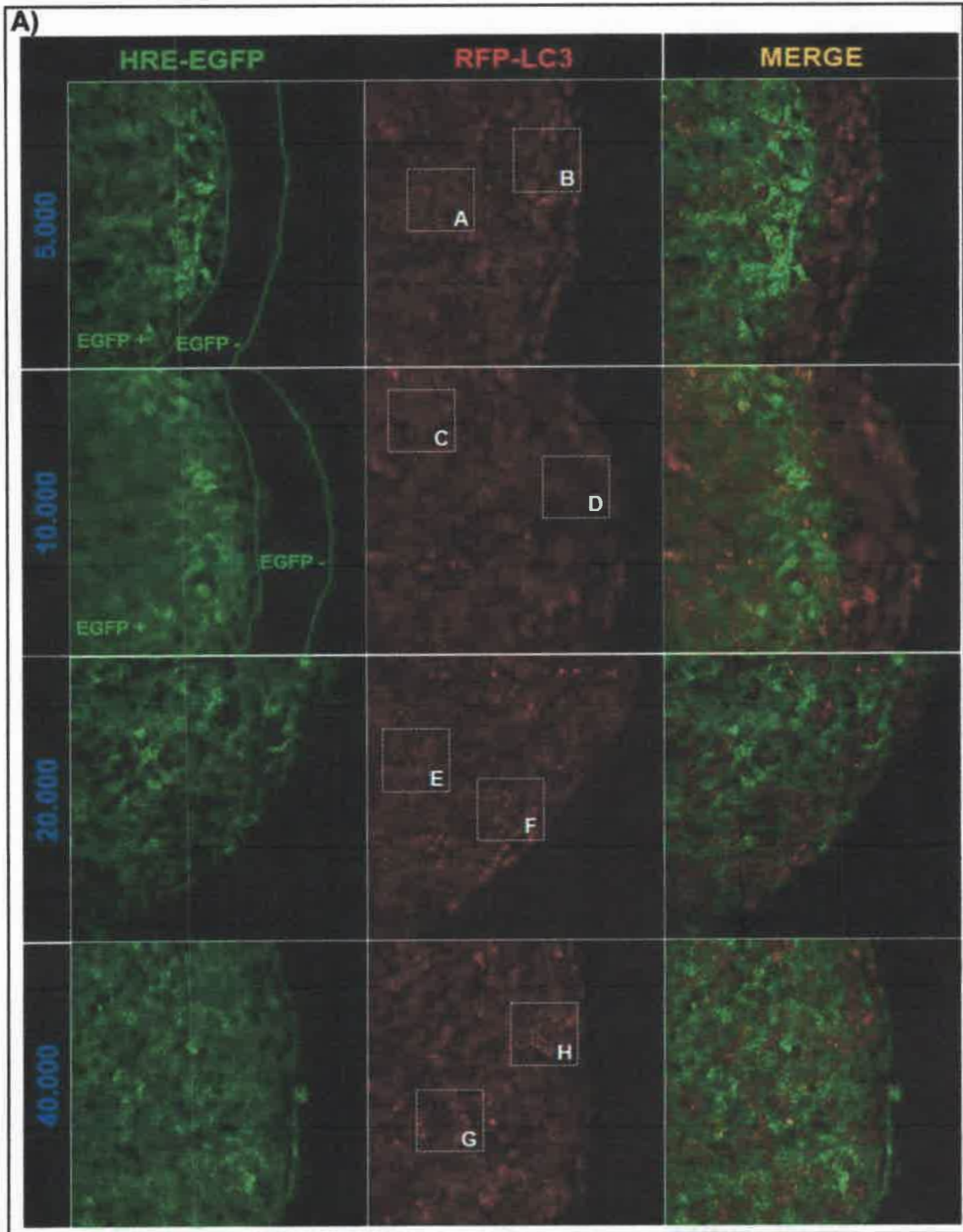
Con la finalidad de determinar si los cultivos tridimensionales de células de cáncer de colon inducen la vía autofágica de manera dependiente de HIF-1, se generaron esferoides SW480-HRE-RL de 5.000, 10.000, 20.000 y 40.000 células iniciales. 72 hs post siembra, los esferoides fueron extraídos y fijados en paraformaldehído 4% durante 24 hs y posteriormente se analizaron mediante microscopía confocal. En la **Fig. 6.4.3.1A** se observan imágenes representativas obtenidas del plano central de cada tipo de esferoides. Confirmando los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia. Los esferoides de 5.000 y 10.000 células presentaron una clara distribución central de la expresión de EGFP, por el contrario, en los esferoides de mayor tamaño, la expresión de EGFP se observa en prácticamente toda el área tumoral analizada. Sin bien la razón por la cual, en estos esferoides, la actividad de HIF-1 se extiende hasta el borde de los mismos, puede ser confusa, una hipótesis es que los esferoides de mayor tamaño (los cuales crecen en iguales condiciones que los de menor tamaño) consumen rápidamente los nutrientes del medio circundante, esto produce una acidificación y limitación de la disponibilidad nutricional del medio, que pueden tener como consecuencia un aumento del estrés oxidativo intratumoral y consecuente activación de HIF-1. Por el contrario, en esferoides de menor tamaño (sin acidificación del medio y alta disponibilidad nutrientes) la activación de HIF-1 está delimitada a las regiones que presentan una disminuida difusión de oxígeno y metabolitos. Además, como se observa en la **Fig. 6.4.3.1B** la expresión de EGFP en esferoides de 10.000 células se induce a una distancia de $\sim 90\mu\text{m}$ del borde, un resultado esperado teniendo en cuenta que una de las

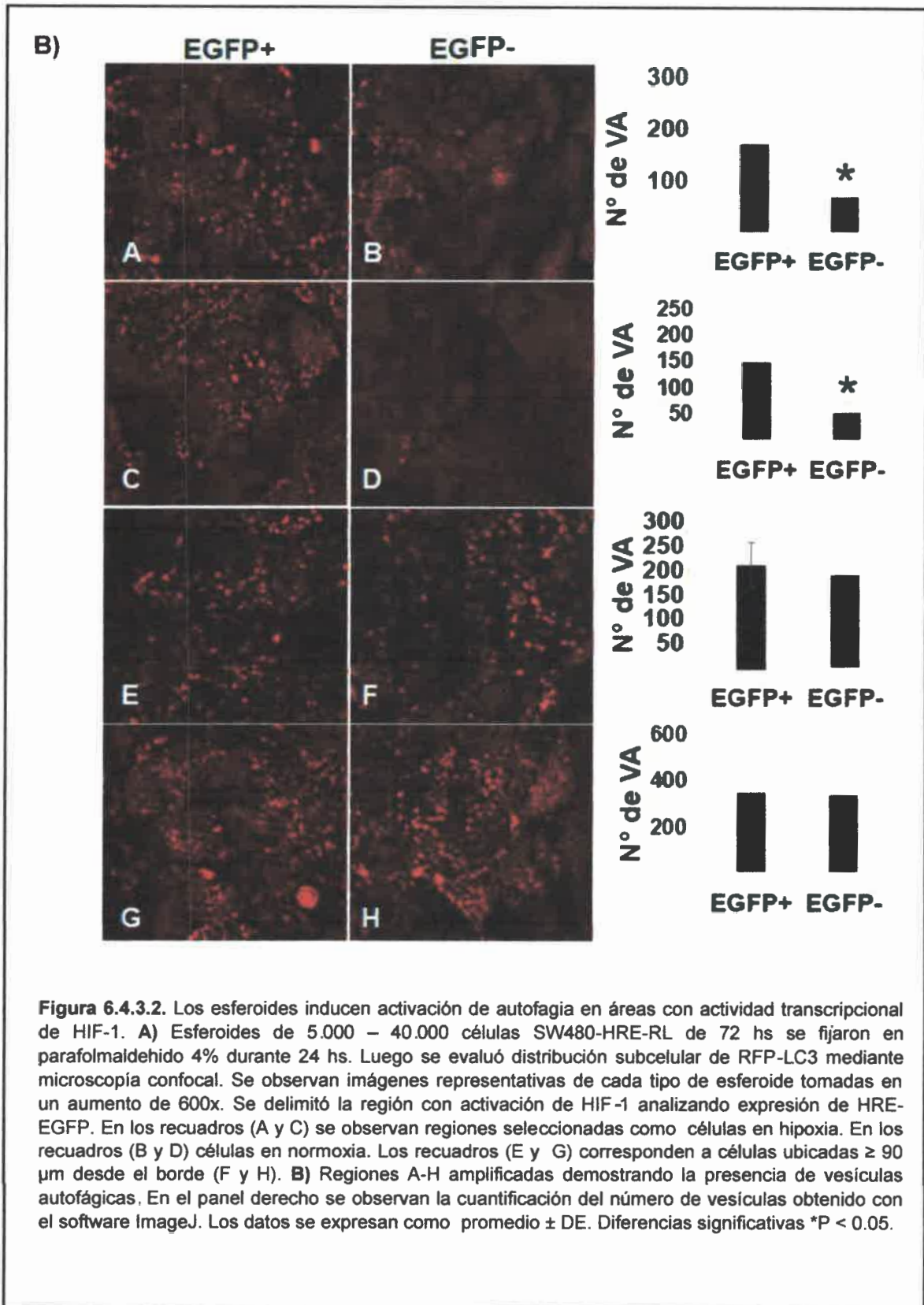
características de los esferoides es la limitada difusión de muchas moléculas, particularmente el oxígeno, entre 100-200 μm (Mehta et al. 2012).

Esto enfatiza las ventajas de utilizar modelos 3D *in vitro* como un modelo eficiente para recrear condiciones fisiológicas de tumores *in vivo*.



Como siguiente paso, se analizó el patrón de distribución de RFP-LC3 en esferoides de diferentes tamaños. En la **Fig. 6.4.3.2A** se observan imágenes representativas de cada uno de los esferoides obtenidas por microscopía confocal.





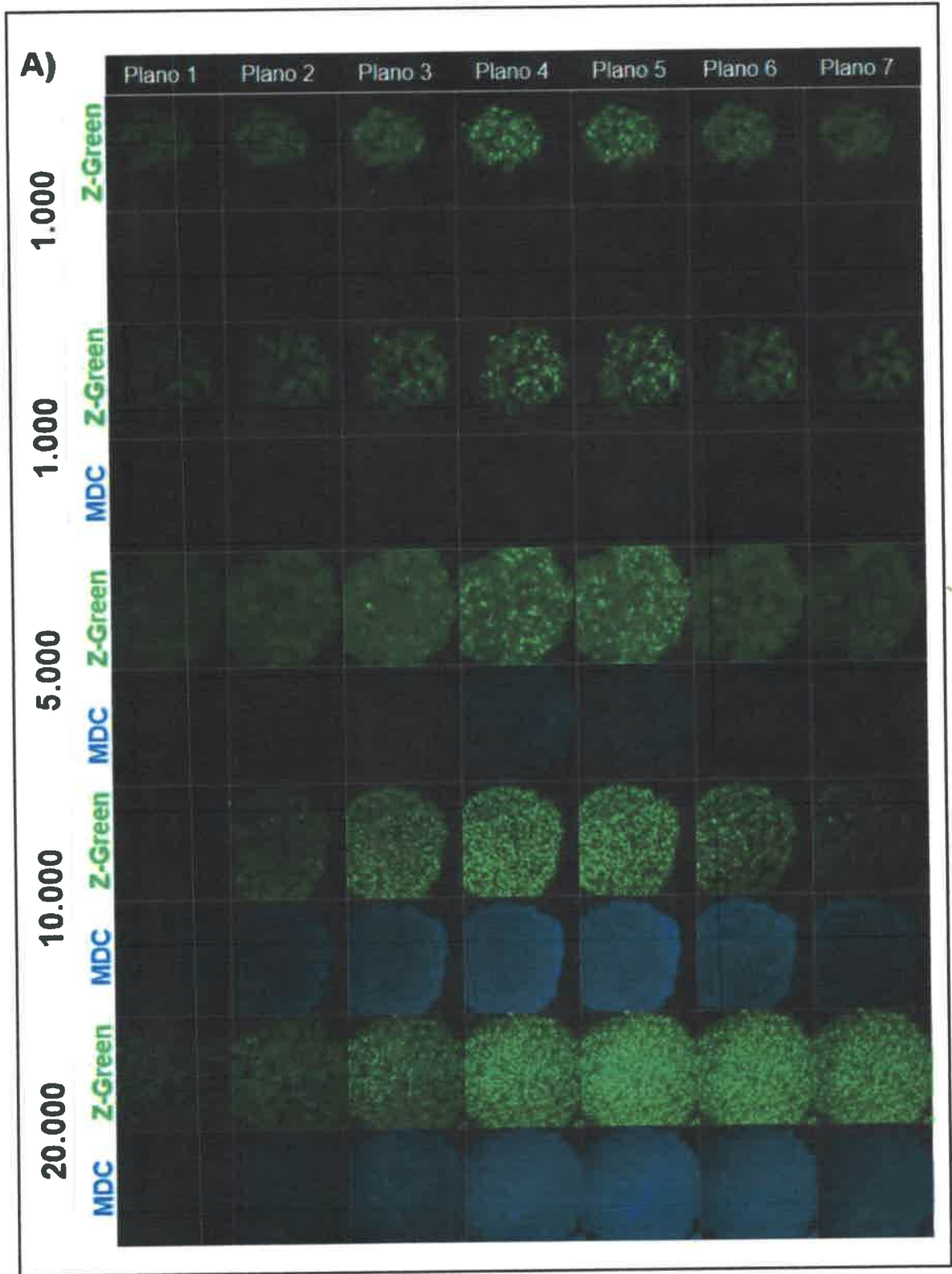
Se determinó la región EGFP+ y EGFP- en esferoides de 5.000 y 10.000 células, se observó una significativa correlación entre las regiones con actividad transcripcional de HIF-1 y un aumento en la cantidad de vesículas autofágicas. Además, empleando el software ImageJ se cuantificó el número de vesículas RFP-LC3 en un área equivalente de EGFP+ y EGFP-. Al mismo tiempo, se cuantificó el número de vesículas en los esferoides de 20.000 y 40.000 células comparando la región periférica (recuadro F y H) con un área equivalente más interna ($\geq 90 \mu\text{m}$ desde del borde, recuadros E y G) (**Fig 6.4.3.2B**). Se demostró que las regiones con actividad de HIF-1 presentan un número significativamente mayor de autofagosomas con respecto a las regiones sin actividad del factor. Además no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el número de autofagosomas de las regiones periférica e interna (ambas con actividad de HIF-1) de los esferoides de mayor tamaño (**Fig. 6.4.3.2B**). En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que la activación de HIF-1 modula el proceso autofágico en cultivos tridimensionales de cáncer de colon.

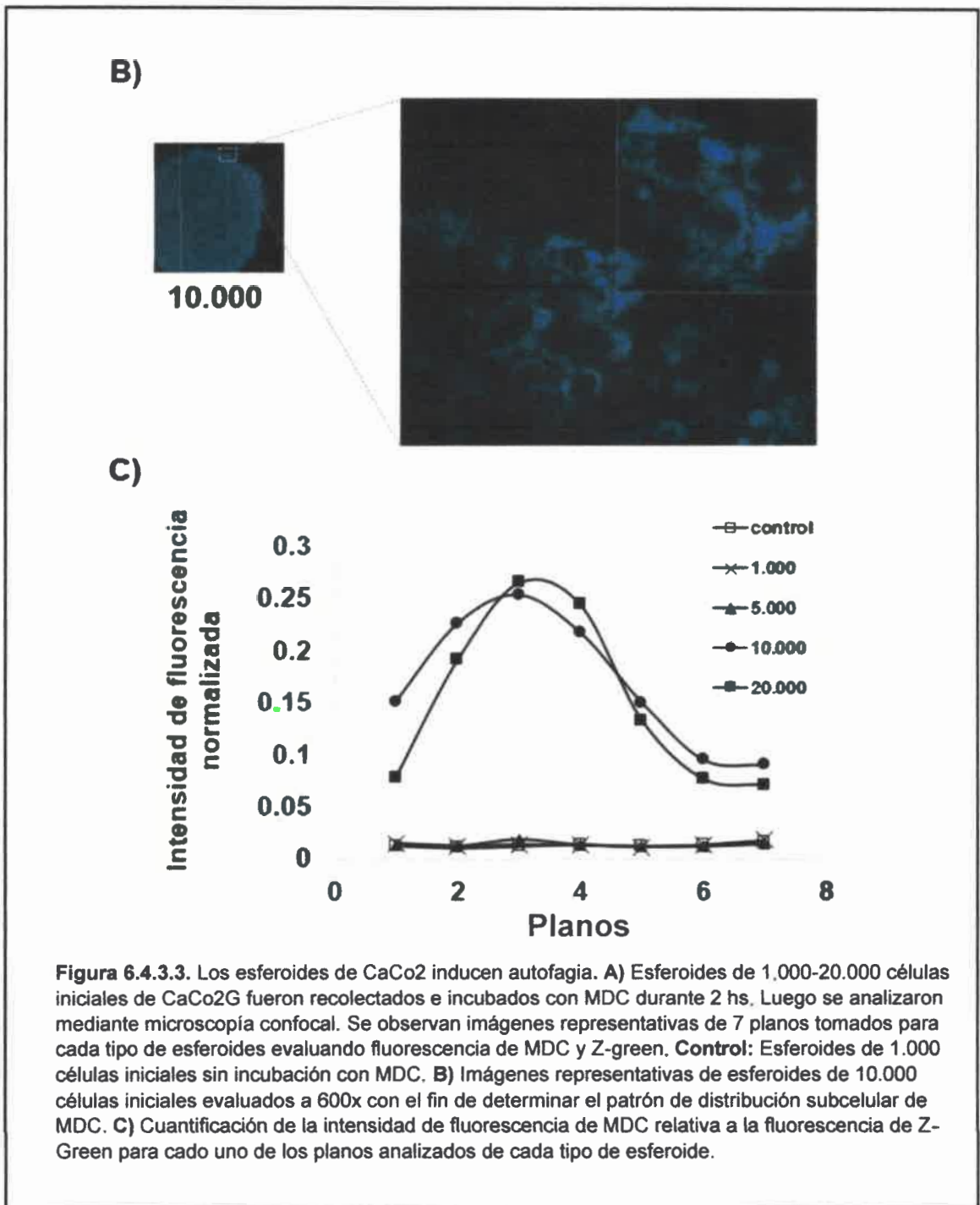
Si bien, como se mencionó en los apartados anteriores, está bien documentado que HIF-1 induce autofagia, muy pocos reportes han demostrado la implicancia de esta vía en sistemas de cultivos complejos (3D) así como en modelos *in vivo*.

Por otro lado, la activación de la autofagia fue confirmada en cultivos tridimensionales de células CaCo2.

Células CaCo2 fueron transfectadas con el plásmido pZ-green. 72 hs post transfección, las células se incubaron con geneticina (G418) durante 21 días con la finalidad de seleccionar la población estable. Luego se generaron colonias según el método de “dilución limitante” para obtener la línea estable monoclonal CaCo2G (Green).

Se generaron esferoides de 1.000, 5.000, 10.000 y 20.000 de células CaCo2G y se incubaron durante 72 hs. Posteriormente los esferoides se incubaron con Monodansilcadaverina (MDC), un marcador de autofagosomas (marca azul), y se evaluaron mediante microscopía confocal. Se tomaron fotografías de 7 planos de cada tipo de esferoide y se evaluó la intensidad de fluorescencia de MDC con respecto a la intensidad de fluorescencia de Z-Green. En la **Fig. 6.4.3.3A** se observan imágenes representativas de los 7 planos analizados. Demostramos que los esferoides de 10.000 y 20.000 células muestran una intensa fluorescencia de MDC con respecto a los esferoides de 1.000 y 5.000 células lo que sugiere aumento de la actividad autofágica.





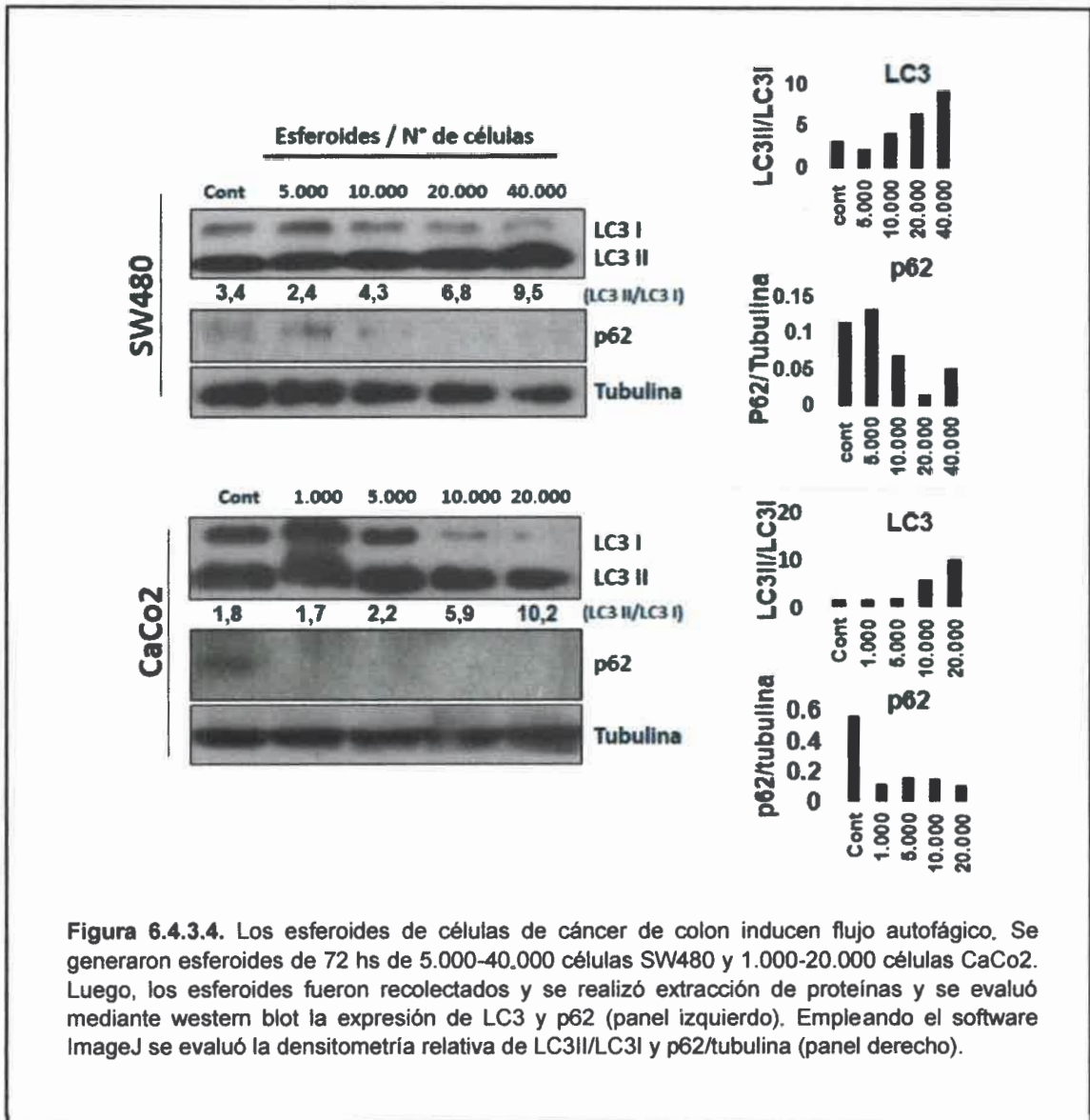
Además en la **Fig. 6.4.3.3B** se observa en un aumento de 600X el patrón de distribución subcelular de MDC, confirmando la presencia de vesículas autofágicas. Finalmente, empleando el software ImageJ cuantificamos la intensidad de fluorescencia de MDC en cada tipo de esferoides. En la **Fig. 6.4.3.3C** se muestra intensidad de MDC relativa a la

intensidad de Z-Green en cada uno de los planos analizados. Se observa un incremento de la fluorescencia de MDC en los planos centrales de los esferoides de 10.000 y 20.000 células. Estos resultados demuestran y confirman la activación de la vía autofágica en esferoides de células de cáncer de colon y apoyan los resultados previamente presentados que afirman que a mayor tamaño de los esferoides aumenta la actividad autofágica.

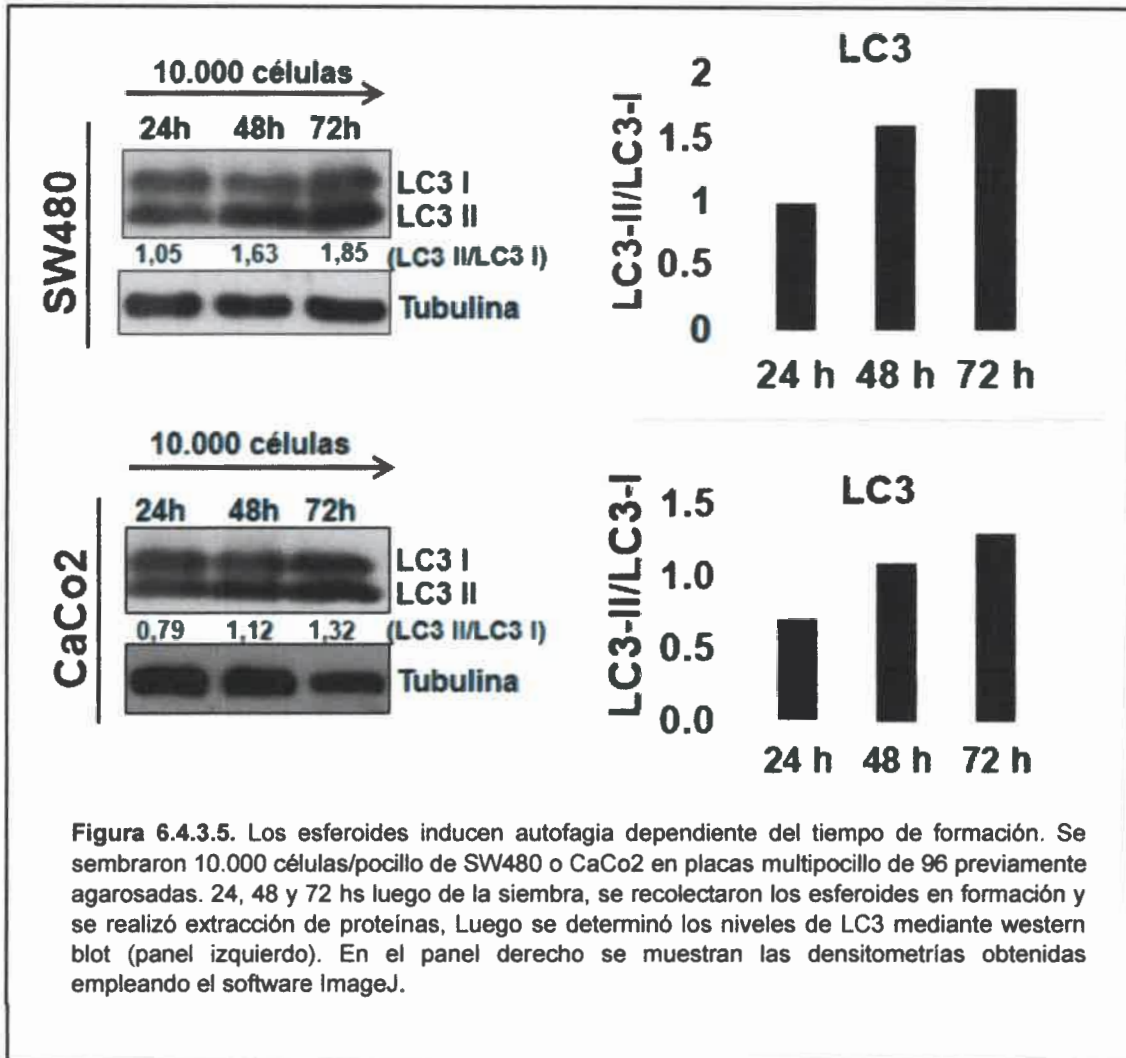
El aumento en el número de autofagosomas puede ser un evento clave durante la activación de la vía autofágica, sin embargo, este fenómeno también puede deberse a un bloqueo del flujo autofágico, en este sentido, un bloqueo de la fusión de autofagosomas con lisosomas (disrupción de flujo autofágico) provoca una acumulación masiva de autofagosomas y se asocia con la muerte celular (Qiu et al. 2014)(Sarkar et al. 2014). (Si bien no evaluamos marcadores específicos de muerte celular, en este trabajo no observamos signos que nos indiquen presencia de sitios necróticos, los cuales han sido propuestos por otros investigadores como una de las características típicas de los esferoides tumorales (Mehta et al. 2012)(Khaitan et al. 2006))

Con la finalidad de determinar si el aumento en el número de autofagosomas se debe a un aumento de la actividad autofágica y no a un bloqueo del flujo, se generaron esferoides de diferentes tamaños con las líneas SW480 y CaCo2 incubados durante 72 hs. Luego se realizó extracción de proteínas y mediante western blot se evaluó procesamiento de LC3 y niveles de expresión de p62. Se observó una correlación entre el aumento de la relación LC3II/LC3I y una disminución del nivel de expresión de p62, demostrando un aumento del flujo autofágico (**Fig 6.4.3.4**).

Estos resultados sugieren: 1- Los esferoides tumorales inducen activación de la autofagia dependiente de su arquitectura tridimensional, ya que se observó un aumento de LC3II/LC3I y disminución de p62 en ambas líneas celulares crecidas como esferoides con respecto al mismo tipo celular crecido en monocapa. 2- A mayor tamaño de los esferoides, mayor activación de autofagia. Esto sugiere que esferoides de mayor tamaño contienen mayor estrés hipóxico y metabólico y por lo tanto actividad autofágica que permita la supervivencia celular en ese microambiente desfavorable.



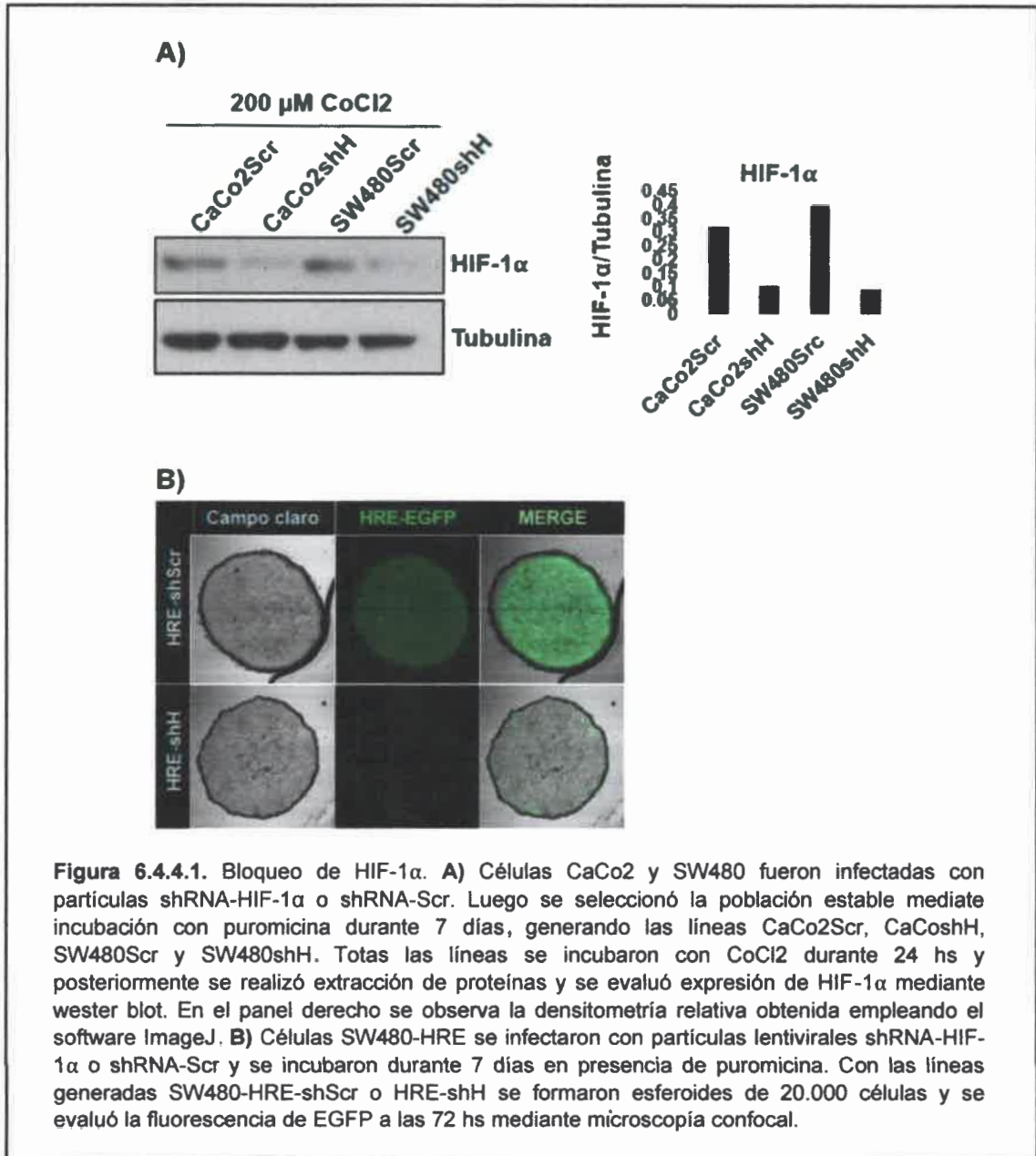
Además, teniendo en cuenta que previamente demostramos que los esferoides inducen expresión de EGFP a partir de las 48 hs post incubación. Se determinó el nivel de procesamiento de LC3 en esferoides de ambas líneas celulares a las 24, 48 y 72 hs post siembra. Se observó que esferoides de ambas líneas inducen procesamiento de LC3 dependiente del tiempo de incubación (Fig. 6.4.3.5) sugiriendo que a mayor compactación se generan sitios hipóxicos con aumento de la actividad de HIF-1 y aumento de la actividad autofágica.



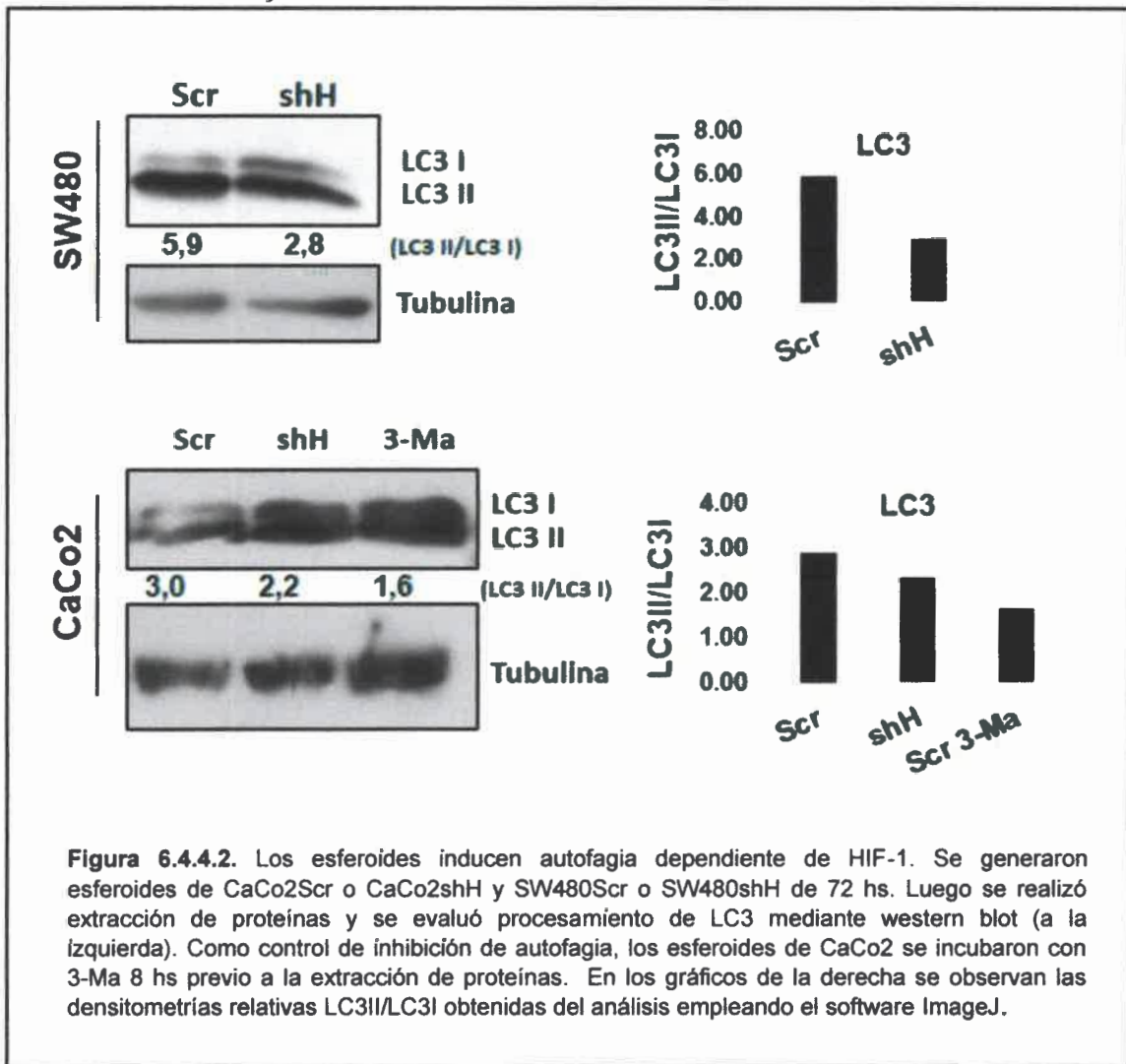
6.4.4. Los cultivos tridimensionales inducen autofagia dependiente de HIF-1

Con la finalidad de evaluar el rol de HIF-1 α como modulador de la actividad autofágica observada en los esferoides tumorales, generamos partículas lentivirales utilizando los plásmidos pLKO.1-shRNA-HIF-1 α o pLKO.1-shRNA-Scramble (Scr). A continuación, células CaCo2, SW480 y SW480-HRE fueron infectadas con partículas shRNA-HIF-1 α o shRNA-Scr y 72 hs post infección se incubaron con puromicina durante 7 días. Como resultado, generamos las líneas estables CaCo2shH, CaCo2Scr, SW480shH, SW480Scr, SW480-HRE-shH y SW480-HRE-Scr.

Con el fin de confirmar el bloqueo del factor HIF-1a en las líneas CaCo2shH o Scr y SW480shH o Scr, células en monocapa fueron incubadas con CoCl₂ y mediante western blot evaluamos niveles de expresión de HIF-1α. Se observó una disminución del nivel de HIF-1α en CaCo2shH y SW480shH incubadas con CoCl₂ con respecto a CaCo2Scr y SW480Scr respectivamente (Fig. 6.4.4.1A).

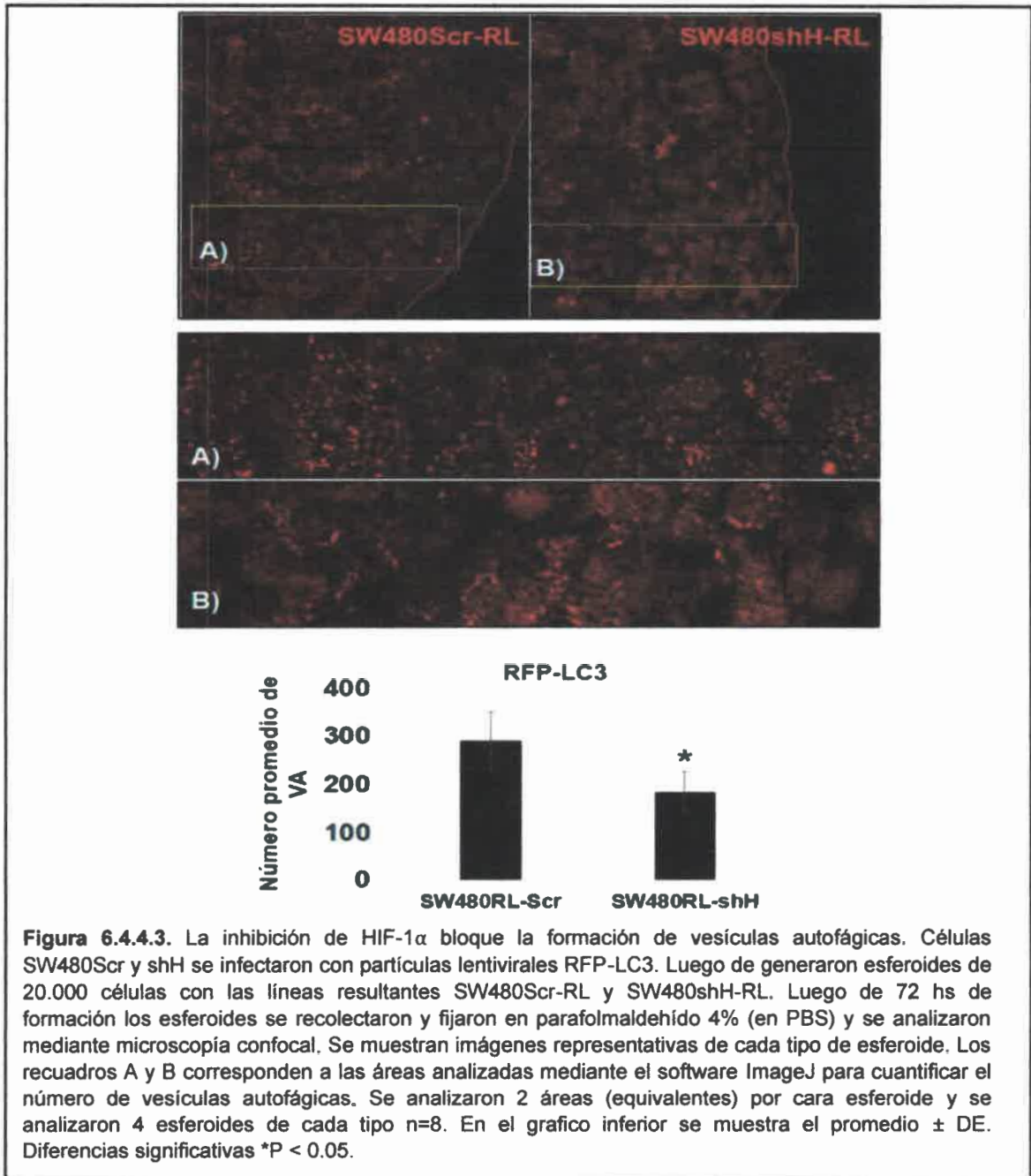


Luego confirmamos el bloqueo de la actividad transcripcional de HIF-1 en cultivos tridimensionales. Se generaron esferoides de 20.000 células iniciales de SW480-HRE-shH y SW480-HRE-Scr y se evaluó expresión de EGFP mediante microscopía confocal. Se observó una significativa disminución de la fluorescencia de EGFP en los esferoides de SW480-HRE-shH con respecto a los SW480-HRE-Scr (**Fig.4.4.1B**). Estos resultados demuestran que los esferoides shH bloquean eficientemente la expresión de HIF-1 α (y actividad de HIF-1).



Luego, mediante western blot, evaluamos procesamiento de LC3 en esferoides de CaCo2shH vs CaCo2Scr y SW480shH vs SW480Scr de 10.000 y 20.000 células iniciales respectivamente.

Como se observa en la Fig. 6.4.4.2 los esferoides shH mostraron una disminución parcial de LC3II/LC3I lo que sugiere una disminución de la actividad autofágica cuando HIF-1 α se encuentra bloqueado.



Además, células SW480shH y SW480Scr fueron infectadas con partículas lentivirales RFP-LC3 generando las líneas SW480shH-RL y SW480Scr-RL.

Luego se generaron esferoides de 20.000 células iniciales de cada línea y mediante microscopía confocal cuantificamos la formación de vesículas autofágicas. Se observa una disminución significativa del número de autofagosomas en esferoides SW480shH-RL con respecto a los SW480Scr-RL (**Fig. 6.4.4.3**). En conjunto, nuestros resultados demuestran que HIF-1 es responsable, al menos en parte, de la regulación del proceso autofágico en el microambiente tridimensional de los esferoides de cáncer de colon.

En este apartado, demostramos que los cultivos tridimensionales de células de cáncer de colon inducen, hipoxia y autofagia, con respecto al mismo tipo celular crecido en monocapa. Esto sugiere que el empleo de estos modelos puede imitar eficientemente ambas características propias de los tumores sólidos *per se* (Mathew et al. 2009).

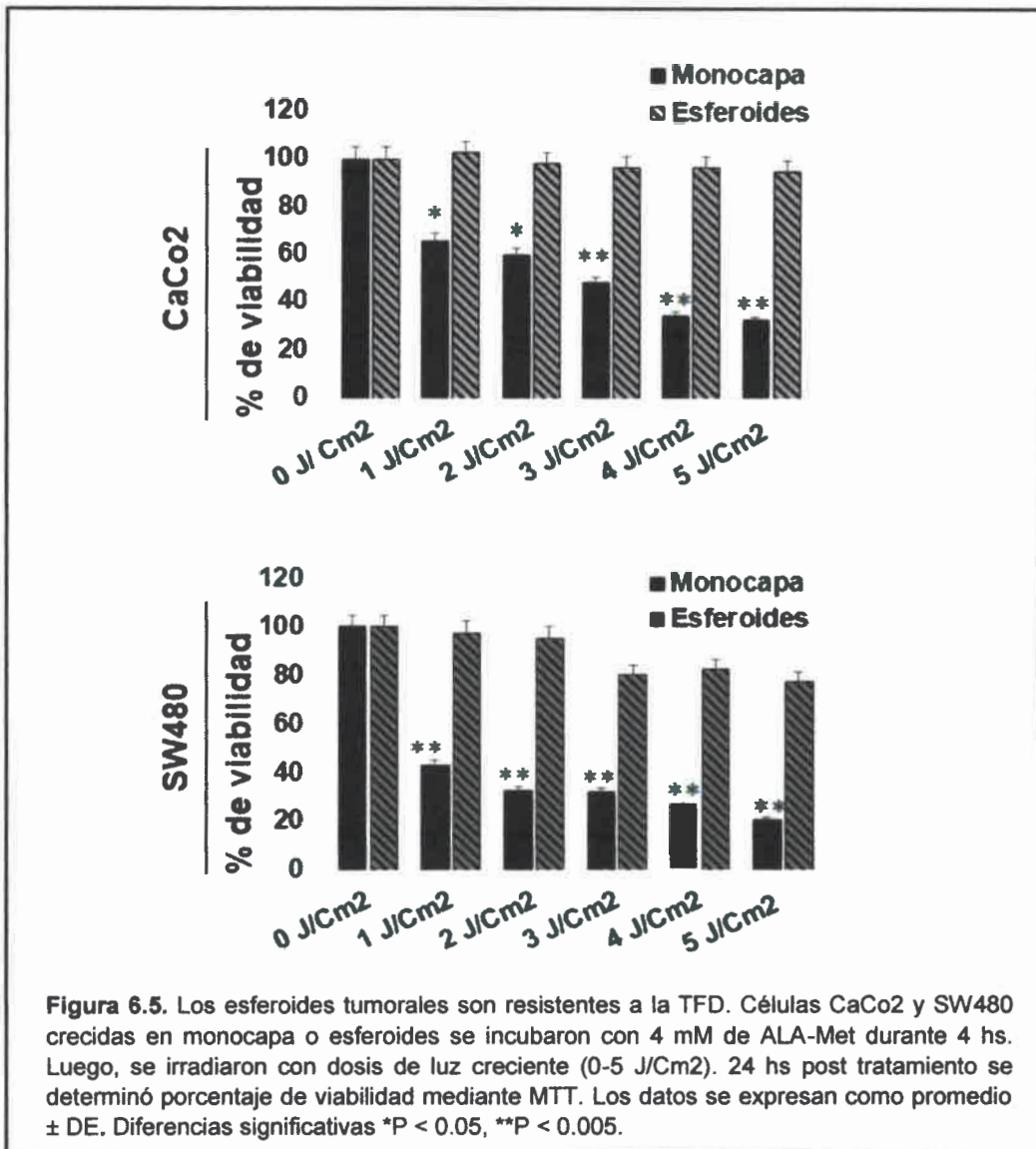
Si bien muchos reportes han demostrado la activación de HIF-1 en cultivos tridimensionales, en este trabajo presentamos un nuevo modelo de identificación de regiones hipóxicas en esferoides a través de la expresión de HRE-EGFP y análisis por microscopía confocal. Además, este modelo nos permitió observar claramente la formación de vesículas autofágicas en dichas regiones hipóxicas. Aunque, como se discutió en el apartado anterior, se ha dilucidado en parte el mecanismo a través del cual HIF-1 controla la activación de la autofagia, aún conocemos muy poco sobre el papel de HIF-1 como modulador de autofagia en un ambiente hipóxico, tridimensional y complejo en donde otras vías moleculares (Ej. mTOR, AMPK), inducidas por falta de nutrientes, bajos niveles energéticos, estrés oxidativo, acidificación, entre otros, pueden controlar la activación del flujo autofágico. En las **Figuras 6.4.4.2 y 6.4.4.3** demostramos que HIF-1 controla, aunque parcialmente, la formación de vesículas autofágicas y procesamiento de LC3 en los esferoides de SW480-RL lo que sugiere la presencia de otras vías activas que modulan la autofagia independientemente del factor de transcripción. Zhang y colaboradores han demostrado que esferoides de células de cáncer de colon inducen aumento del procesamiento de LC3 con respecto a células crecidas en monocapa (Zhang et al. 2014), aunque el mecanismo subyacente no ha sido reportado. En este sentido, este trabajo proporciona evidencias, aun no reportadas por otros autores, de que los cultivos tridimensionales de cáncer de colon inducen autofagia en las regiones hipóxicas, de forma dependiente de HIF-1. Además, nuestro trabajo concuerda con los estudios de Bernhard Brune y colaboradores, quienes demostraron mediante microscopía electrónica, que esferoides de células HepG2 inducen la

formación de vesículas de doble membrana en las capas externas de los esferoides donde se observa aumento de la expresión de HIF-1 α , además el bloqueo de HIF-1 α con shRNA disminuye significativamente la formación los autofagosomas. Sin embargo, resulta interesante que la autofagia observada en las regiones perinecroticas de los esferoides, es independiente del estatus de HIFs (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-1 β) sugiriendo la presencia de otros mecanismo activos que controlan el proceso autofágico independientes de HIFs (Menrad et al. 2010). Por otra parte, aún queda por explorar si las vías de regulación estudiados en los modelos 2D (HIF-1/BNIP3/miR-210/VMP1) se encuentran activas en el microambiente tumoral hipóxico. En este sentido, el equipo de trabajo de Brune también demostró que el silenciamiento de HIF-1 α en esferoides HepG2 disminuye la expresión del mRNA de BNIP3.

La identificación de estas vías activas en cultivos 3D *in vitro* podría tener implicancias clínicas ya que podrían ser propuestos como nuevos targets en el tratamiento anticancerígeno. Esto, teniendo en cuenta que en los últimos años la autofagia se ha propuesto como un posible factor pronóstico de malignidad tumoral (Ma et al. 2011). En este sentido X. Ma y colaboradores demostraron que esferoides de células de melanoma metastásico reestablecen el fenotipo autofágico observado en biopsias de pacientes con melanoma agresivo, lo cual no se observa en las mismas células crecidas en cultivos 2D. Esto sugiere: 1- los modelos de cultivos 3D reproducen más acertadamente la activación de la autofagia observada en el microambiente tumoral *in vivo*, que los mismos tipos celulares crecidos en 2 dimensiones. 2- los niveles de autofagia intratumoral se asocian con un fenotipo agresivo y pobre sobrevida de pacientes (Ma et al. 2011).

Resulta necesario, realizar estudios para evaluar el impacto de la autofagia en el microambiente tumoral del cáncer de colon en lo que respecta a la progresión de la enfermedad así como a la respuesta frente a los tratamientos antitumorales.

Por tal motivo, como siguiente objetivo de esta tesis, evaluamos el impacto de la autofagia activada por HIF-1 sobre la respuesta al tratamiento fotodinámico en esferoides de CaCo2 y SW480.



6.5. Los esferoides tumorales son resistentes a la TFD

El uso de los esferoides tumorales está bien establecido como herramienta para la investigación de la respuesta tumoral a diferentes tratamientos anticancerígenos.

En el contexto de la terapia fotodinámica, Christensen y colaboradores, fueron los pioneros en el empleo de cultivos 3D para evaluar la respuesta a la TFD. Estos estudios demostraron que los esferoides tumorales son resistentes a la TFD con respecto al mismo tipo celular cultivado en monocapa (Christensen et al. 1984). Sin embargo, actualmente los mecanismos moleculares implicados en dicha resistencia siguen siendo poco comprendidos.

Con el objetivo de determinar si los esferoides de células de cáncer de colon muestran resistencia a la TFD/ALA-Met, células CaCo2 y SW480, en monocapa y esferoides, se incubaron con 1 mM de Met-ALA durante 4 hs y luego se irradiaron con dosis de luz creciente. Como se observa en la **Fig. 6.5**, al aumentar la intensidad de la terapia hubo una disminución dependiente de la dosis en ambas líneas crecidas en monocapa, sin embargo, los esferoides no respondieron al tratamiento.

6.5.1. Incorporación de ALA-Met en esferoides tumorales

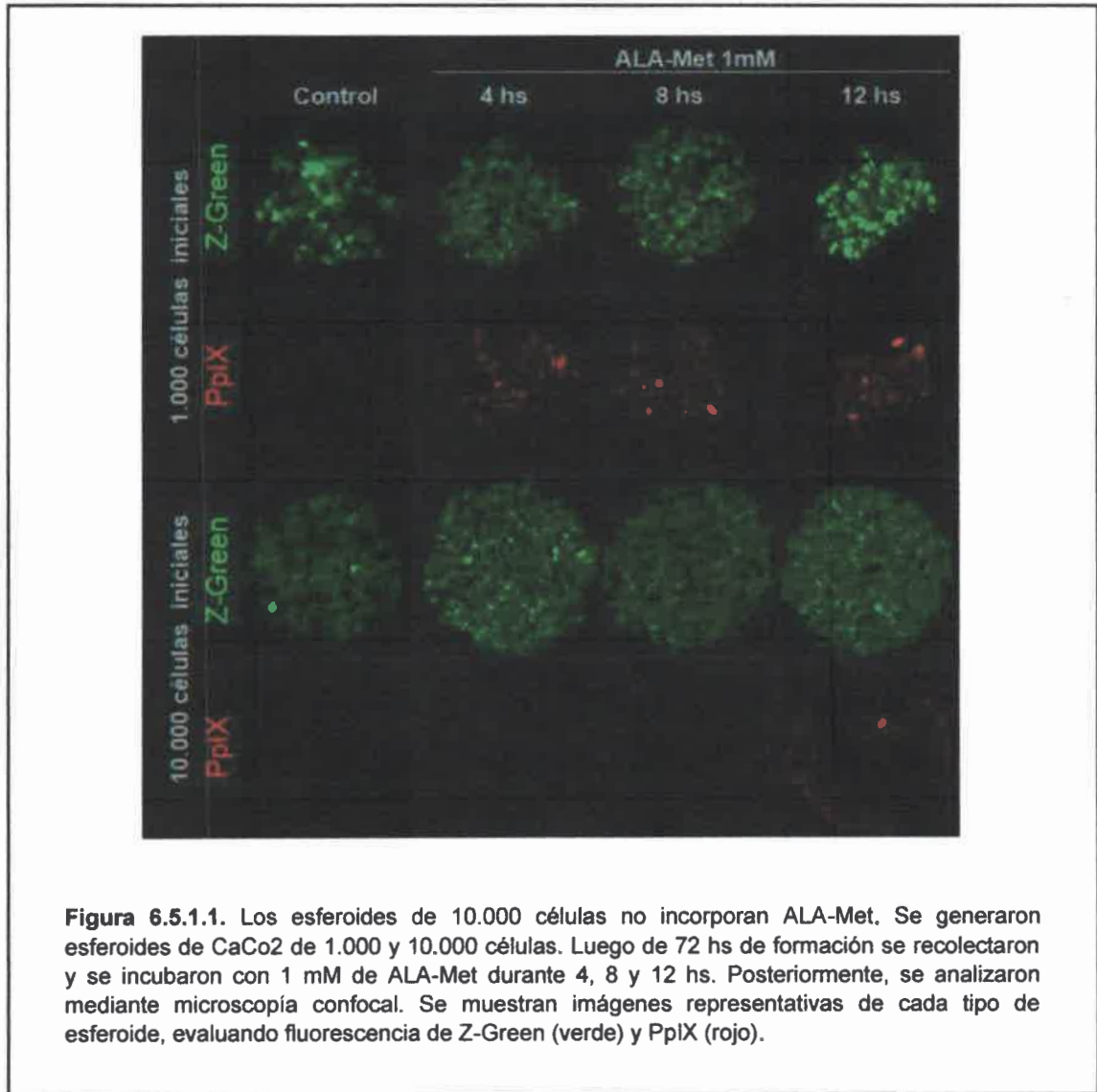
La permeabilidad tumoral es un determinante crucial de la sensibilidad y el transporte de drogas y es uno de los factores determinantes de la resistencia tumoral a diversos tratamientos (Tannock et al. 2002). Por esta razón, los esferoides tumorales se han vuelto una herramienta conveniente *in vitro* para estudiar el impacto del microambiente tridimensional sobre las limitaciones en la difusión de fármacos (Sutherland et al. 1979)(Durand & Olive 2001)(Durand & Sutherland 1972)(West et al. 1984).

Con el fin de evaluar la hipótesis de que los esferoides de células de cáncer de colon son insensibles a la TFD debido a una limitada penetración del ALA-Met, se analizó la producción de PpIX en el interior de los mismos. Se generaron esferoides de 1.000 y 10.000 células CaCo2G y se incubaron con 1 mM de ALA-Met, durante 4, 8 y 12 hs. Seguidamente se evaluó mediante microscopía confocal la fluorescencia de la protoporfirina IX (PpIX). La PpIX absorbe fotones (luz) a 400 nm color azul, y emite fotones (fluorescencia) a 635 nm de color rojo.

En la **Fig.6.5.1.1** se muestran imágenes representativas del plano central de cada esferoide. Se observó que bajo condiciones de incubación correspondientes al tratamiento en monocapa (1mM de ALA-Met durante 4 hs), no se detectó PpIX en los esferoides de 10.000 células. Estos resultados demuestran que la resistencia observada anteriormente se debe, principalmente, a la escasa penetración del FS en los esferoides tumorales.

Por otro lado, luego de 12 h de incubación se observó la presencia de fluorescencia de PpIX en los bordes de los esferoides de 10.000 células.

A pesar de que el derivado metilado (ALA-Met), posee una aumentada lipofilicidad (con respecto a ALA) lo que consecuentemente aumenta su permeabilidad a través de las membranas celulares (Kloek & Beijersbergen van Henegouwen 1996), la ausencia

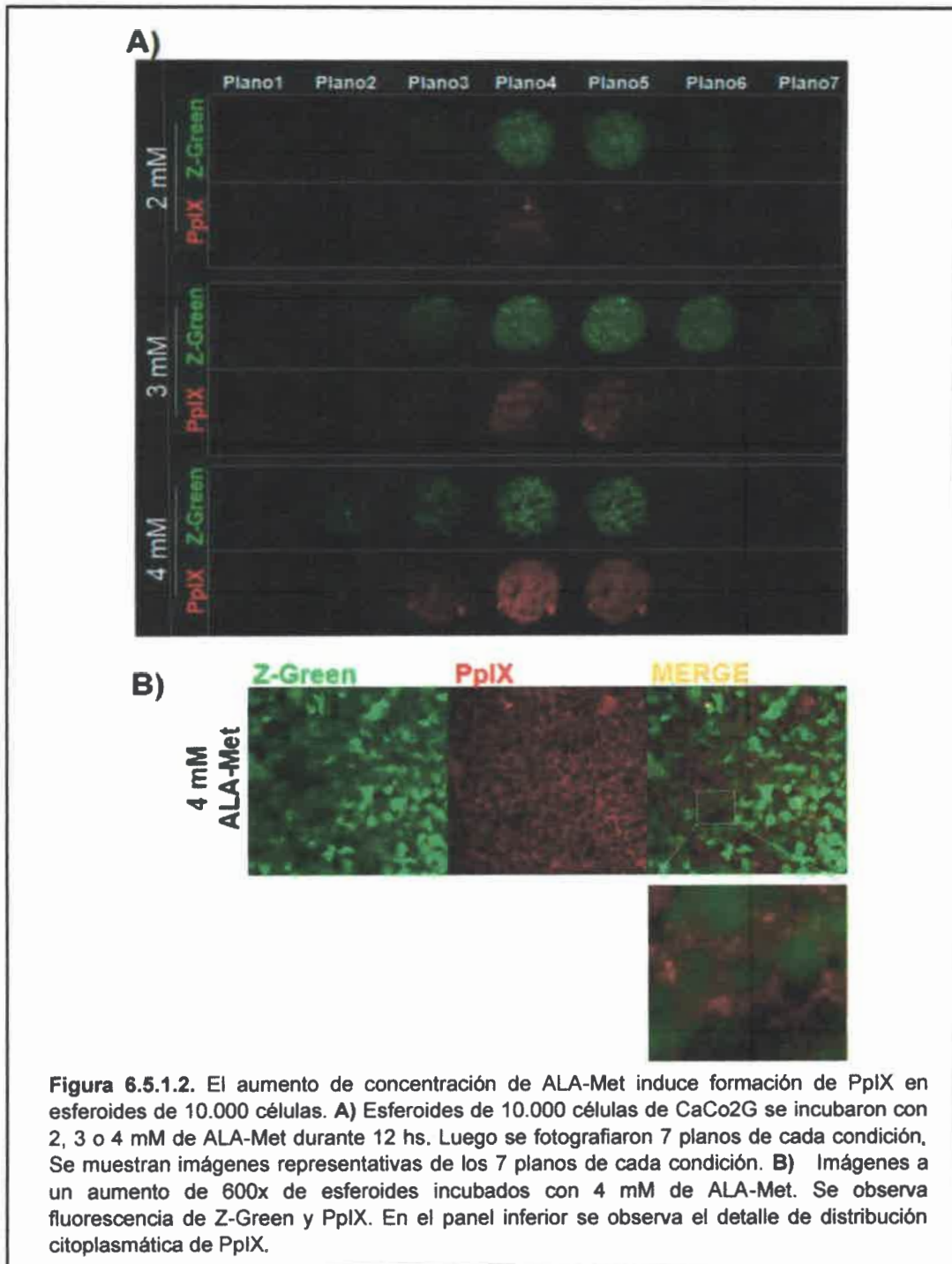


de fluorescencia de PpIX en el interior de los esferoides se puede interpretar como una penetración disminuida de ALA-Met. Sin embargo, cabe destacar, que la producción de Protoporfirina IX luego de la incorporación de ALA, puede verse afectada por condiciones fisiológicas, el tipo celular o estatus de proliferación (Bigelow et al. 2001). En este sentido, se ha demostrado que la tensión de oxígeno así como el pH son algunos de los factores que afectan negativamente la producción de PpIX intracelular (Wyld et al. 1998) por lo tanto es de esperar que la producción de FS PpIX este disminuida en las regiones hipóxicas de los esferoides. Bigelow y colaboradores, evaluaron la habilidad

de ALA y el derivado lipofílico ALA-Hex (ALA-Hexylester) de penetrar en esferoides tumorales de células EMT6 y demostraron que en ambos casos la PpIX se acumula preferencialmente en las capas más externas de los mismos. Según estos autores el gradiente de fluorescencia observado se debe: 1- diferencias en la capacidad de producción de PpIX en las diferentes capas celulares de los esferoides. 2- disminución de la permeabilidad de ALA y su derivado (Bigelow et al. 2001).

La captura, distribución y retención de un FS en el tumor depende de la ruta de administración, modo de transporte (Ej. liposomas), propiedades físico-químicas (Ej. lipofilicidad) así como de la concentración de la droga. En este sentido, estudios previos han demostrado que la producción de PpIX a partir de ALA puede ser estimulada *in vivo* incrementando la dosis del mismo (Kennedy et al. 1990)(Kloek & Beijersbergen van Henegouwen 1996).

Por tal motivo evaluamos si es posible aumentar producción de PpIX en el interior de los esferoides aumentando la concentración de ALA-Met en el medio de cultivo. Con este fin, esferoides de 10.000 células se incubaron durante 12 hs con concentraciones crecientes de ALA-Met: 2, 3 y 4 mM, y se evaluó la fluorescencia de PpIX mediante microscopía confocal. En la **Fig.6.5.1.2A** se muestran imágenes representativas de los 7 planos analizados en cada condición. Se demostró que el aumento de la concentración de ALA-Met, provocó un incremento de la producción de PpIX en el interior de los esferoides de forma dependiente de la dosis. Por otro lado, determinamos el patrón de distribución subcelular de PpIX analizando su fluorescencia en aumento de 600x. Como se observa en la **Fig. 6.5.2B**, PpIX posee una localización citoplasmática (no difusa), sin signos de localización nuclear, un resultado esperado teniendo en cuenta su mecanismo de síntesis y reportes que han evidenciado su localización en mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana plasmática (Rosenkranz et al. 2000).



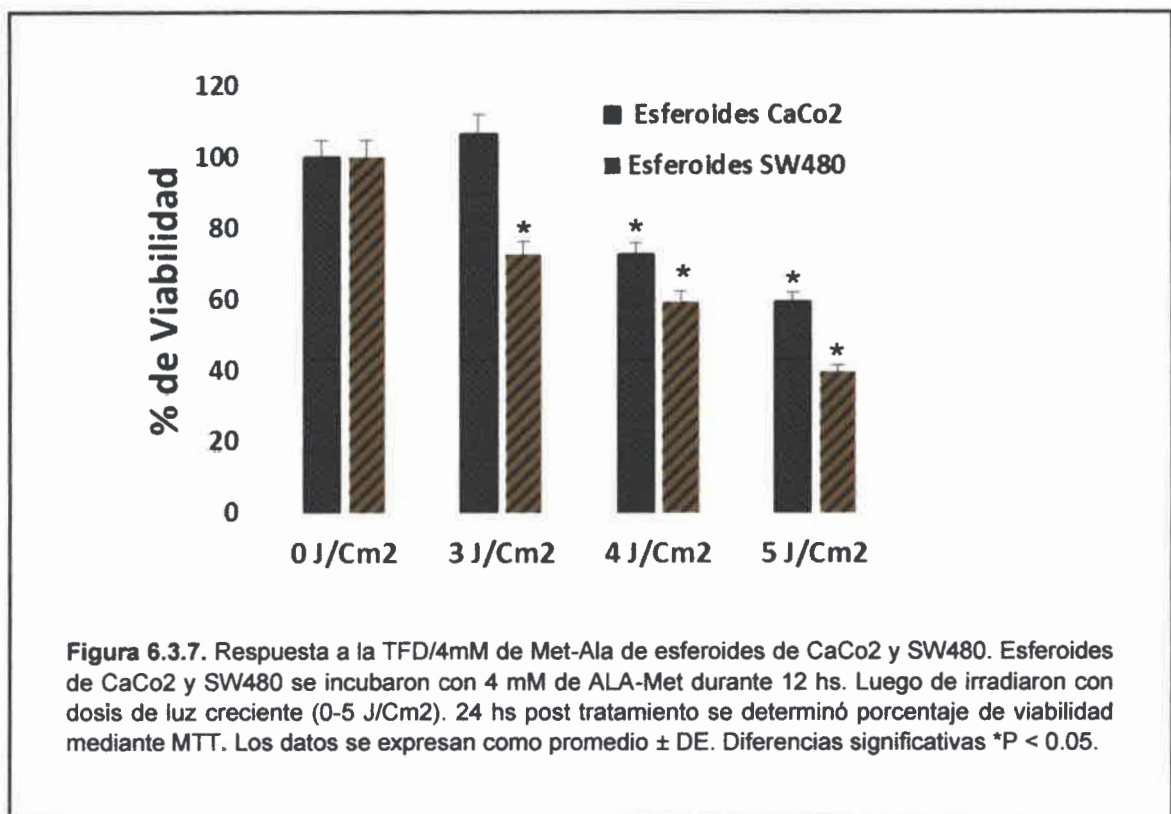
Nuestros resultados demuestran que los cultivos 3D tienen una penetración limitada al ALA-Met por lo que es necesario diseñar nuevas condiciones de tratamiento que aseguren la correcta incorporación del FS (4mM de ALA-Met, 12 hs). Teniendo en cuenta que la luz a 636 nm puede penetrar en la piel hasta 2 mm de profundidad

(Hamblin, Michael R. Huang 2013), consideramos que la resistencia observada en los esferoides se debió a la baja concentración del FS en su interior y no a una escasa llegada de luz, ya que el diámetro promedio máximo de los esferoides es de ~800 nm.

6.5.2. TFD/4 mM ALA-Met

Se evaluó si con las nuevas condiciones de tratamiento, los esferoides responden a la TFD.

Esferoides de CaCo2 y SW480 de 10.000 y 20.000 células respectivamente fueron incubados con 4 mM de Met-ALA durante 12 hs y luego sometidos a dosis crecientes de irradiación. En la Fig. 6.3.7 se puede observar una disminución de la viabilidad con altas dosis de TFD. Sin embargo cabe aclarar que se observó una considerable variabilidad en cuando a repuesta (% de viabilidad) post tratamiento entre los distintos experimentos llevados a cabo.



Las nuevas condiciones de TFD son:

- Esferoides de CaCo2: 12 hs de incubación con 4 mM de Met-ALA. 5 J/Cm² de irradiación.
- Esferoides de SW480: 12 hs de incubación con 4 mM de Met-ALA. 4 J/Cm² de irradiación.

6.6. HIF-1/autofagia protege a los esferoides tumorales del efecto fototerapéutico

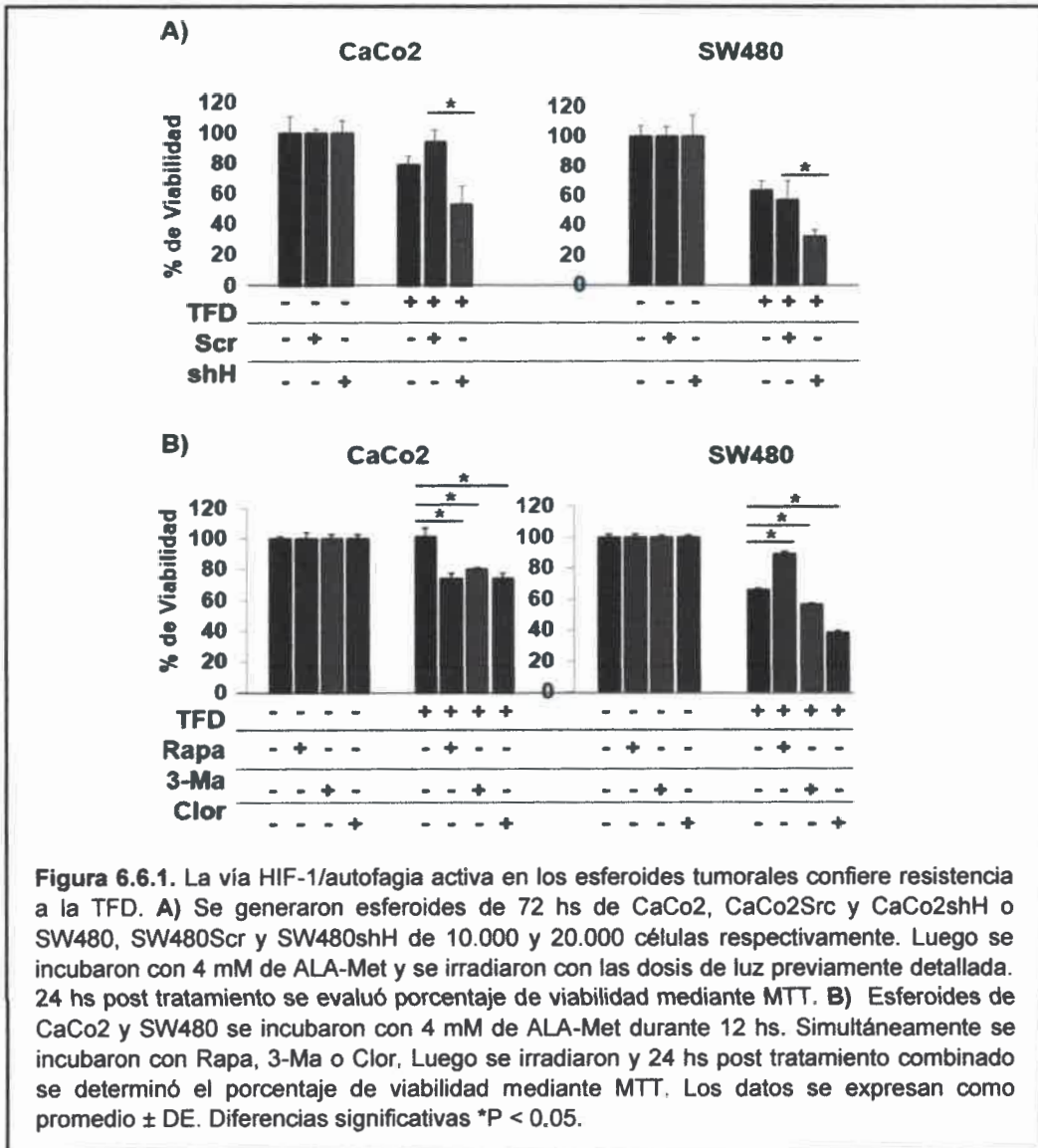
La activación de la vía autofágica en cultivos tridimensionales, ha sido previamente vinculada a la resistencia a quimioterapia. Sin embargo, no hay reportes que evalúen el rol de este mecanismo como promotor de supervivencia en cultivos 3D sometidos a TFD. Además, teniendo en cuenta que previamente demostramos que la autofagia se induce en los esferoides tumorales de forma dependiente de HIF-1, y que la vía HIF-1/autofagia confiere resistencia a la TFD en células crecidas en monocapa, evaluamos si la vía HIF-1/autofagia inducida en cultivos 3D de células de cáncer de colon confiere resistencia al tratamiento.

Con este fin, se generaron esferoides tumorales de CaCo2Scr, CaCo2shH, SW480Scr y SW480shH. Luego, se incubaron durante 12 hs con 4 mM de ALA-Met y posteriormente se irradiaron con las dosis previamente mencionadas. 24 hs post tratamiento se evaluó porcentaje de viabilidad mediante MTT. Se observó que la inhibición de HIF-1 α sensibilizó los esferoides de ambas líneas celulares al efecto de la TFD, demostrando que HIF-1 confiere resistencia en los cultivos tridimensionales (**Fig.6.6.1A**).

Por otro lado, se generaron esferoides de CaCo2 y SW480 y se aplicó el tratamiento combinado TFD + Rapa, 3-Ma o Clor. Se observó que el bloqueo de la autofagia sensibiliza al efecto de la TFD en ambas líneas celulares (**Fig. 6.6.1B**).

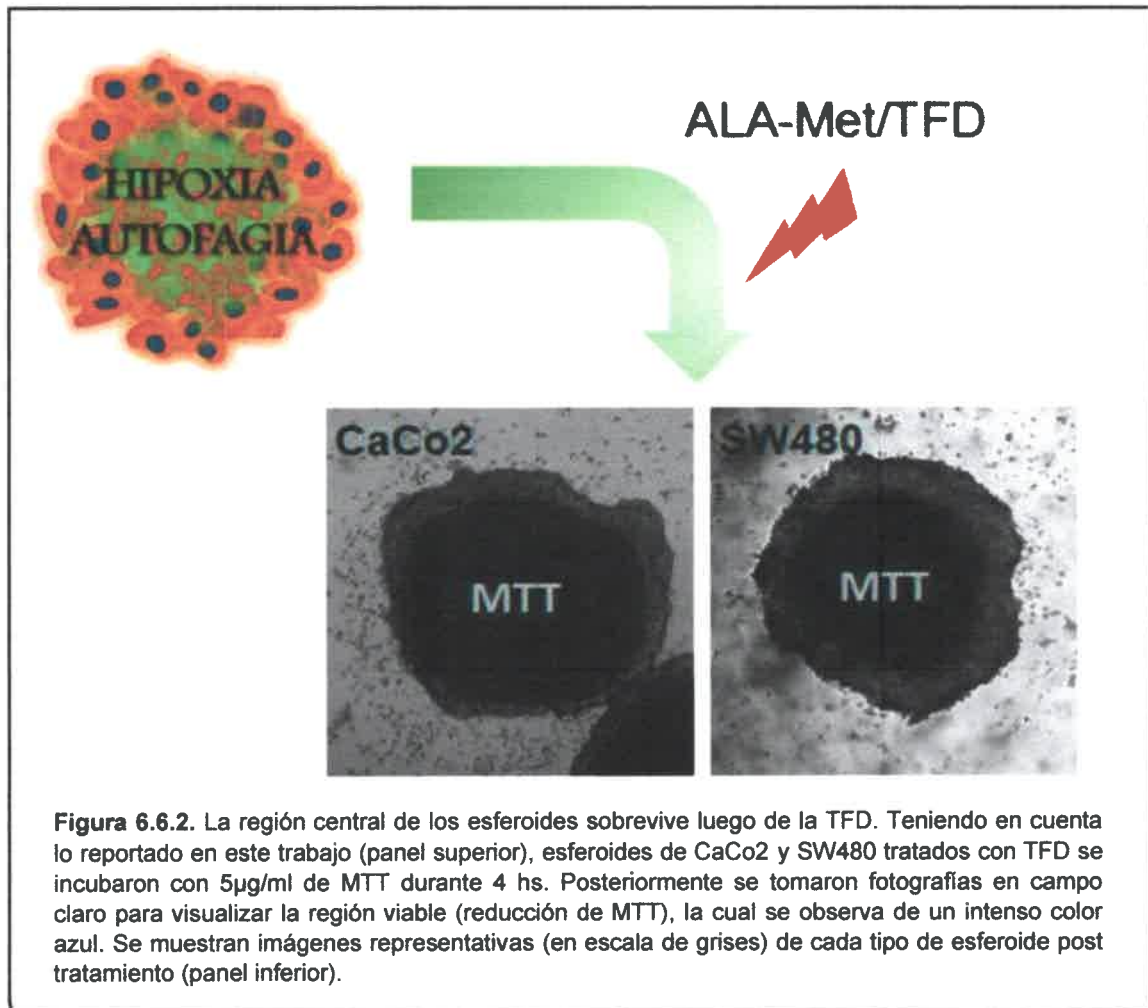
Estos resultados sugieren que la autofagia, como mecanismo activo en regiones hipóxicas de los esferoides tumorales, puede explicar, al menos en parte la resistencia tumoral al tratamiento previamente demostrada y reportada por otros autores.

Estos resultados pueden tener implicancias desde el punto de vista clínica. En este sentido, se ha reportado que la presencia de regiones hipóxicas se relacionan con una pobre respuesta tumoral al tratamiento fotodinámico.



Esto puede deberse a: 1- La eficiencia de la TFD disminuye a baja concentraciones de oxígeno, ya que en general, se considera que la producción de oxígeno singlete (reacción tipo II) es el principal mediador de la muerte celular post TFD. 2- la presencia de regiones hipóxicas están vinculadas a la defectuosa vasculatura tumoral, que en consecuencia genera sitios intratumorales con una disminuida llegada de oxígeno y

nutrientes y en consecuencia también disminuye la llegada del FS. 3- nuestros resultados sugieren fuertemente que además, en estas regiones hipóxicas, la activación de la autofagia mediada, en parte, por el factor HIF-1 contribuye no solo a la supervivencia de células tumorales al estrés propio del microambiente tumoral hipóxico, sino que también confiere resistencia al tratamiento fotodinámico.



Curiosamente, los esferoides de SW480 incubados con rapamicina (inductor de autofagia) se mostraron más resistentes al tratamiento fotodinámico, por el contrario, los esferoides de CaCo2 son sensibilizados tanto con rapamicina como con 3-Ma y Clor. Este resultado puede deberse a la dualidad de la autofagia en el contexto de la biología tumoral. Si bien está claro que la autofagia puede accionar como mecanismo de supervivencia, en algunos casos puede promover la muerte celular (Mathew, Karantz-

Wadsworth, et al. 2007). Se ha propuesto que el rol dual de la autofagia depende de la capacidad de las células a realizar apoptosis. En líneas generales, en células apoptosis-competentes la autofagia actúa principalmente como un mecanismo de supervivencia, en células con defectos en la maquinaria de apoptosis, la autofagia actúa como una vía de muerte celular (Mathew, Karantza-Wadsworth, et al. 2007).

Según Mathew y colaboradores, en tumores con defectos en la maquinaria de apoptosis, los inhibidores de autofagia pueden inducir muerte celular por necrosis. En combinación con otras terapias, las células sobrevivientes se encuentran en un microambiente estresante, susceptibles a la inhibición del mecanismo de supervivencia autofágico. Por otro lado, los activadores de autofagia pueden usarse para estimular la “muerte celular autofágica” (Mathew et al. 2007).

Si bien, a partir de los estudios de Christensen y colaboradores, muchos reportes han demostrado la resistencia de los cultivos tridimensionales a la terapia fotodinámica (Kamuhabwa et al. 2003)(Madsen et al. 2006), según nuestra extensa búsqueda bibliográfica, **este es el primer reporte que demuestra que los esferoides tumorales inducen autofagia en el centro hipóxico, a través de HIF-1, lo cual confiere resistencia a la TFD.** Además, cabe destacar que en nuestro modelo de estudio, observamos que las células centrales de los esferoides, las cuales inducen activación de HIF-1/autofagia, son las que sobreviven luego del tratamiento **Fig. 6.6.2/esquema.** Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hirschberg y colaboradores, quienes observaron que esferoides de células de glioma tratados con ALA/TFD inducen muerte celular principalmente en la periferia. Ya que ALA penetró completamente en el volumen tumoral, este efecto fue atribuido a la hipoxia generada en el centro de estos esferoides (Madsen et al. 2000)(Mathews et al. 2009).

Los primeros estudios que intentan explicar la resistencia a TFD observada en los esferoides tumorales fueron realizados por Weist y colaboradores, quienes demostraron que esferoides de células de cáncer de colon WiDr son resistentes a la TFD de manera dependiente del tamaño. La importancia de estos estudios radica en que, teniendo en cuenta que la presencia de oxígeno es esencial para la sensibilización dependiente de FS/Luz, si los esferoides (de 100-250 μm) son disgregados previo a la irradiación, y se irradian las células resultantes en suspensión, éstas mantienen la resistencia lo que sugiere fuertemente la presencia de mecanismos moleculares activados en el contexto

tridimensional de los esferoides que confieren resistencia al tratamiento (West 1989)(West & Moore 1992).

Aunque posteriormente, diversos estudios demostraron la implicancia de la Hipoxia intratumoral (empleando esferoides tumorales) como un factor negativo en la respuesta al tratamiento fotodinámico (Mitra & Foster)(Foster et al. 1993)(Coutier et al. 2001)(Evans et al. 2011), en la actualidad no hay reportes que demuestren la implicancia de las vías moleculares inducidas en el microambiente hipóxico (mediadas principalmente por HIF) como mediadores de la muerte o supervivencia celular luego de la TFD en un contexto tridimensional.

Por lo tanto, el entendimiento de los mecanismos moleculares activados en el microambiente hipóxico de tumores sólidos nos permitirá diseñar nuevas modalidades de tratamientos que tengan en cuenta el papel del microentorno en la regulación de vías de supervivencias que pueden ser las responsable del fracaso de muchos tratamientos a nivel clínico.

Hasta el momento, en este trabajo se puso en evidencia el importante rol de la autofagia como mecanismo de resistencia de células de carcinoma colorrectal a la terapia fotodinámica. Por un lado, como mecanismo inducido por la TFD, a través del Factor Inducible por Hipoxia, el cual regula la actividad del promotor de *vmp1*. Por otro lado, la autofagia como mecanismo propio de los de los cultivos tridimensionales (arquitectura similar a tumores sólidos) que confiere resistencia a la TFD. Por la tanto, cabe preguntarnos si la inhibición terapéutica de la vía autofágica podría sensibilizar tumores de cáncer de colon (*in vivo*) al tratamiento fotodinámico.

Reiners y colaboradores, proponen que luego de la terapia fotodinámica, la autofagia incrementa la resistencia de células tumorales a un nuevo ciclo de tratamiento. Según esta hipótesis, en estudios realizados en animales, los Fotosensibilizadores se acumulan tanto en el tumor como en la vasculatura tumoral. La erradicación del tumor luego del tratamiento, es una consecuencia de la muerte directa de las células tumorales así como la destrucción de la vasculatura tumoral (Dougherty, et al., 1998). Esto último podría causar una disminución de nutrientes así como hipoxia, dos eventos que darían como resultado la activación de la autofagia (Lum, et al., 2005). Dado el rol pro-supervivencia de la autofagia, el daño vascular mediado por la TFD puede contribuir a

la adaptación de las células tumorales a su microambiente hipóxico y aumentar la resistencia de las células de cáncer que sobrevivieron a subsiguientes ciclos de TFD. Aunque este modelo no ha sido validado experimentalmente *in vivo*, es posible que la combinación de TFD con inhibidores de autofagia resulte en un aumento de la eficiencia del tratamiento (Reiners, et al., 2010).

Como último objetivo de esta tesis, se puso a prueba esta hipótesis (Reiners, et al., 2010) y validamos nuestros resultados en un modelo *in vivo*.

6.7. HIF-1 controla autofagia en xenografías de ratones inmunodeprimidos

Con la finalidad de determinar la generación de sitios hipóxicos y formación de vesículas autofágicas en xenografías de ratones inmunodeprimidos, se inyectaron ratones nude ($nu^{-/-}$) con 3×10^6 células SW480-HRE-RL. Se generaron dos tumores por ratón (1 flanco derecho, 1 flanco izquierdo). Luego de 72 hs de crecimiento, se extrajeron y fueron fijados en formol, emparafinados y posteriormente se realizaron cortes histológicos los cuales se analizaron mediante microscopía confocal. En la **Fig. 6.7.1A** se muestran imágenes representativas de un corte histológico de 5 μm de grosor de un tumor HRE-RL. Se observó la presencia de sitios con expresión de EGFP en la región periférica del tumor. Aunque no observamos expresión que EGFP en la región central de los tumores analizados, esto puede deberse a por lo menos a tres razones: 1- la formación de capilares sanguíneos que permiten la llegada de oxígeno en la región central. 2- la vasculatura anormal de los tumores se traduce en la generación de un microambiente tisular, crónicamente carente de oxígeno y glucosa (Sahin et al. 1991)(Gardner et al. 2001)(Zhang et al. 2014), en este sentido, se ha reportado que la estabilización de HIF-1 en hipoxia, depende de la presencia de glucosa (Osada-Oka et al. 2010). 3- La activación de la muerte celular (apoptosis o necrosis) de regiones con hipoxia crónica de los tumores.

A pesar de ello, nuestros resultados demuestran que los tumores de cáncer de colon contienen regiones con actividad transcripcional de HIF-1 y concuerdan con lo reportado por otros autores que observaron la presencia de sitios con actividad de HIF-1 empleando la línea tumoral de próstata PC3 HRE-EGFP/HRE-Luc-ODD/tdTomato (Danhier et al. 2015).

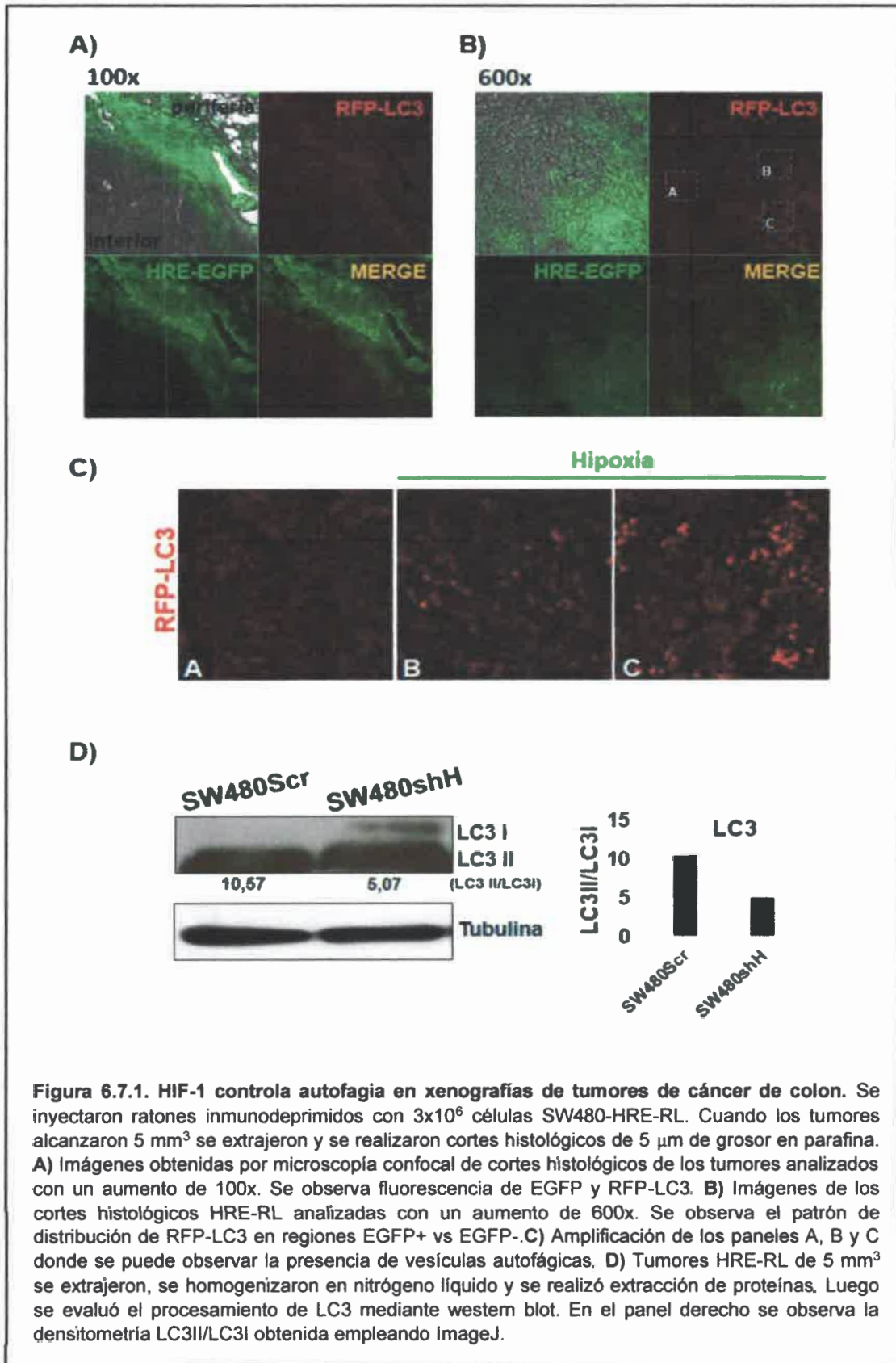
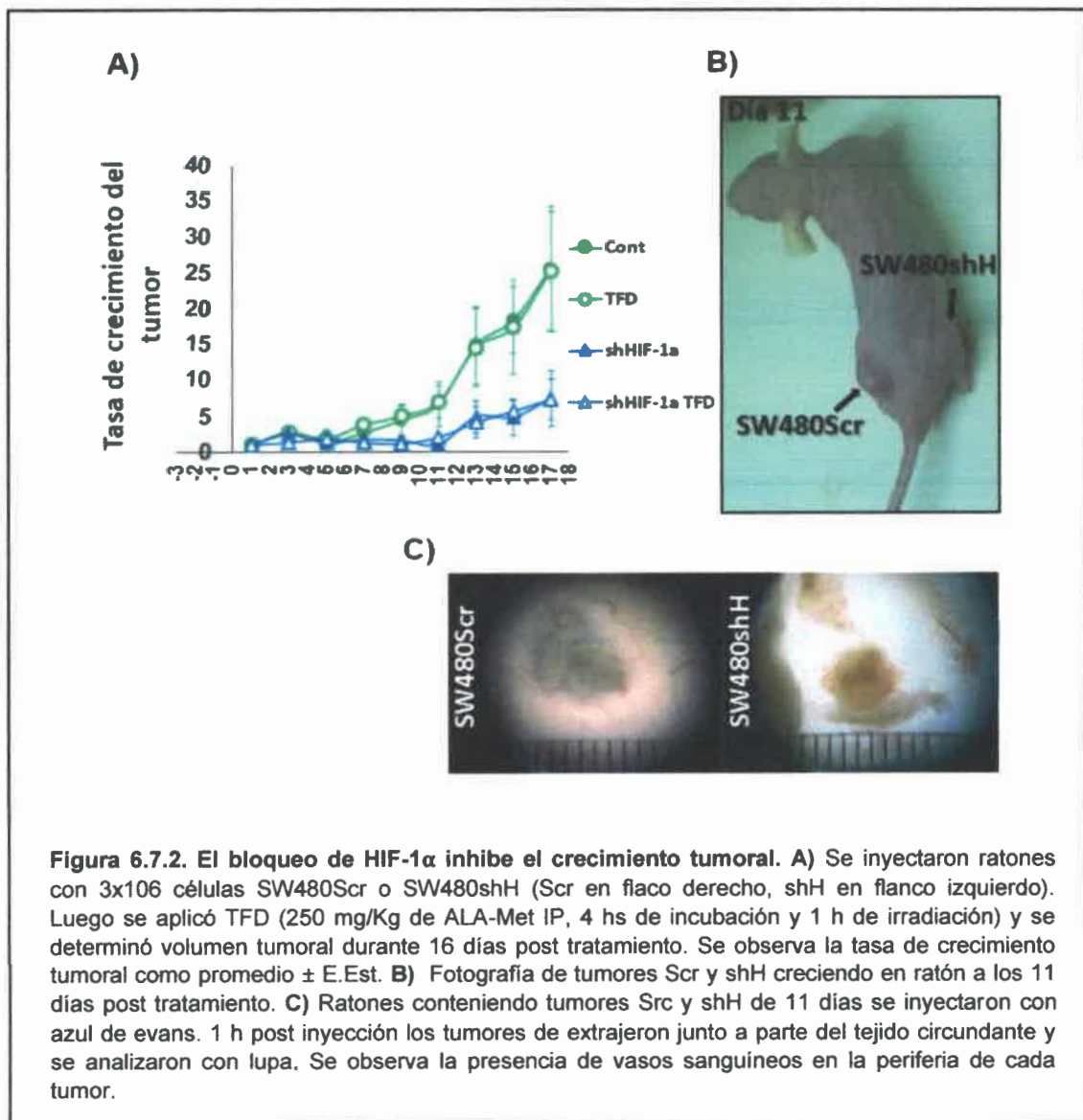


Figura 6.7.1. HIF-1 controla autofagia en xenografías de tumores de cáncer de colon. Se inyectaron ratones inmunodeprimidos con 3×10^6 células SW480-HRE-RL. Cuando los tumores alcanzaron 5 mm^3 se extrajeron y se realizaron cortes histológicos de $5 \mu\text{m}$ de grosor en parafina. **A)** Imágenes obtenidas por microscopía confocal de cortes histológicos de los tumores analizados con un aumento de 100x. Se observa fluorescencia de EGFP y RFP-LC3. **B)** Imágenes de los cortes histológicos HRE-RL analizadas con un aumento de 600x. Se observa el patrón de distribución de RFP-LC3 en regiones EGFP+ vs EGFP-. **C)** Amplificación de los paneles A, B y C donde se puede observar la presencia de vesículas autofágicas. **D)** Tumores HRE-RL de 5 mm^3 se extrajeron, se homogenizaron en nitrógeno líquido y se realizó extracción de proteínas. Luego se evaluó el procesamiento de LC3 mediante western blot. En el panel derecho se observa la densitometría LC3II/LC3I obtenida empleando ImageJ.

Por lo expuesto, se analizaron los cortes en un aumento de 600x con el fin de determinar el patrón de distribución subcelular de RFP-LC3. Como se observa en la **Fig. 6.7.1 B y C** se encontró un aumento en el número de vesículas autofágicas en la región EGFP+ con respecto a la región EGFP-. Estos resultados sugieren que HIF-1 podría controlar la autofagia *in vivo*.



Con la finalidad de demostrar este punto, se inyectaron ratones con 3×10^6 células SW480Scr y SW480shH. A las 72 hs de crecimiento, los tumores fueron extraídos y homogeneizados para posteriormente realizar extracción de proteínas. Luego mediante

western blot evaluamos procesamiento de LC3. Como se observa en la **Fig. 6.7.1 D** los tumores shH muestran una disminución de LC3II/LCI con respecto a los Scr. En conjunto estos resultados demuestran que HIF-1 controla la autofagia en xenografías de tumores de cáncer de colon.

Previamente demostramos que la inhibición de HIF-1 α , bloquea la activación de la autofagia, lo cual, en última instancia sensibiliza células de cáncer de colon (cultivos 2D y 3D) a l efecto de la terapia fotodinámica.

Con la finalidad de validar estos resultados *in vivo* generamos tumores SW480Scr y SW480shH. Luego de 72 hs de crecimiento, los ratones se inyectaron con 250 mg/Kg de ALA-Met intraperitonealmente y se incubaron durante 4 hs antes de ser irradiados 1 h con luz led roja (636nm). En la **Fig. 6.7.2 A** se observa la evolución de los tumores post tratamiento (Tasa de crecimiento tumoral) durante los siguientes 17 días luego de la irradiación. En la **Fig. 6.7.2 B** se observan ambos tipos de tumores crecidos uno en cada flanco del ratón a los 10 días post tratamiento. Determinamos que los esferoides shH (sin TFD) muestran una significativa disminución del crecimiento con respecto a los tumores Scr (sin TFD). Por otro lado, y al contrario de lo esperado, no observamos cambios en el crecimiento tumoral luego de la TFD tanto en tumores Scr como en los shH. Si bien, se ha reportado una pobre respuesta de los tumores de cáncer de colon a la TFD, y se ha implicado al microambiente tumoral hipóxico como responsable de este hecho, la escasez de respuesta de los tumores shH puede deberse al hecho de que la inhibición de HIF-1 α , resulta en un bloqueo de la capacidad angiogénica del tumor.

La carencia de vasos no solo puede explicar la disminución del crecimiento tumoral (debido a la falta de suplencia de nutrientes), sino que además, teniendo en cuenta que el FS se aplicó vía intraperitoneal, la llegada del mismo al tejido tumoral depende del transporte a través de los capilares sanguíneos. Por tal motivo, analizamos la formación de vasos en tumores Scr y shH controles al día 10 del tratamiento. Como se observa en la **Fig. 6.7.2 C** hubo una disminución en el número de vasos que rodean a tumores shH con respecto a los tumores Scr. Este resultado nos sugiere que el empleo de tumores shHIF-1 α no sería una buena estrategia para evaluar protocolos de TFD empleando FS de administración sistémica.

6.8. Tratamiento combinado *in vivo*: TFD + inhibidor de autofagia

Uso de cloroquina como inhibidor de autofagia *in vivo*

En los últimos años, el concepto de reposicionamiento de drogas ha tomado gran importancia en la investigación en cáncer. Este concepto, se basa en la idea de utilizar fármacos de acción conocida empleados en un contexto particular, para un nuevo fin, es decir, el uso de drogas conocidas con un nuevo propósito clínico. El reposicionamiento de fármacos permite superar mucho de los problemas involucrados en la producción de nuevas drogas contra el cáncer, los cuales puede retrasar por años la llegada de éstas a estudios clínicos así como al mercado (Ashburn & Thor 2004)(Reichert 2003), ya que los candidatos para el reposicionamiento usualmente han sido aprobados por los agentes reguladores (FDA, MEA y MHLW) y se conocen sus perfiles de seguridad y farmacocinética. En este escenario, cualquier fármaco aprobado puede ser rápidamente evaluado para nuevos usos terapéuticos en estudios clínicos de fase II.

En este sentido, la cloroquina es un claro ejemplo de reposicionamiento de fármacos. La cloroquina ha sido ampliamente utilizada como tratamiento profiláctico contra la malaria (Wiesner et al. 2003) y actualmente se emplea como parte de la terapia combinada (a quimioterapia) contra el cáncer. Este fármaco, difunde a través de las membranas celulares, se protona, y se acumula en organelas ácidas como los lisosomas (Solomon & Lee 2009). Este tropismo hacia los lisosomas ha redefinido a la cloroquina (y sus derivados) como un inhibidor de la fase tardía de la macroautofagia (He & Klionsky 2009)(Klionsky & Emr 2000). Una vez en lisosomas, inhibe las proteasas lisosomales y previene la fusión de autofagosomas a lisosomas, lo que la ha convertido en uno de los fármacos más ampliamente utilizados para inhibir autofagia tanto *in vitro* como *in vivo* (Amaravadi et al. 2011)(Hu et al. 2008) y actualmente es utilizado en diversos ensayos clínicos con el fin de estudiar si la inhibición de la autofagia puede incrementar el efecto terapéutico de las terapias anti-cáncer actuales (Maycotte et al. 2012)(Gorski et al. 2012). Sin embargo, el uso de cloroquina como tratamiento combinado con TFD *in vivo* aún no ha sido explorado.

Con la finalidad de evaluar el efecto del tratamiento combinado TFD/cloroquina, se inyectaron ratones con 3×10^6 células SW480 las cuales formaron tumor a las 72 hs.

Los ratones se dividieron aleatoriamente en 4 grupos (n: 6 tumores/tratamiento):

- 1-Tumor Control: sin TFD y sin cloroquina.
- 2-Tumor TFD: Solo con TFD.
- 3-Tumor Cloroquina: Solo con cloroquina.
- 4-Tumor TFD/Cloroquina: Combinación de TFD y cloroquina.

Al día 0, los grupo 3 y 4 fueron inyectados, intraperitonealmente (IP) con 20 mg/Kg de cloroquina. Al día 1, el grupo 2 fue inyectado con 250 mg/Kg de ALA-Met e incubado durante 4 hs. El grupo 3 fue inyectado con 20 mg/Kg de cloroquina. El grupo 4 fue inyectado con 20 mg/Kg de cloroquina + 250 mg/Kg de ALA-Met e incubado durante 4 hs. Luego del tiempo de incubación del ALA-Met, los grupos 2 y 4 fueron irradiados durante 1 h con luz led roja (636 nm). La administración de cloroquina se realizó diariamente en los grupos 3 y 4 durante los siguientes 16 días de duración del tratamiento y se determinó la tasa de crecimiento tumoral de todos los grupos.

Los resultados se observan en la **Fig.6.8.1 A**. Como se demostró anteriormente, los tumores tratados solo con TFD son resistentes al tratamiento. Sin embargo, el tratamiento solo con cloroquina, disminuyó parcialmente el crecimiento tumoral. Silvia Cufi y colaboradores han propuesto que la inhibición de la autofagia con cloroquina (y en combinación con quimioterapia) puede ser una buena estrategia para aumentar la eficiencia del tratamiento antitumoral en aquellos tumores “adictos” a la autofagia, en los cuales la activación de ésta vía molecular promueve la supervivencia y progresión del tumor (Cufi et al. 2013). Nuestros resultados sugieren que los tumores de cáncer de colon “necesitan” de la autofagia para promover su crecimiento, posiblemente como mecanismo protector contra su microentorno hipóxico y desfavorable.

Por otro lado, y en acuerdo con lo propuesto por Cufi y col, el bloqueo de la autofagia con cloroquina, sensibilizó los tumores de cáncer de colon resistentes al efecto fotodinámico ya que hubo una significativa disminución del crecimiento tumoral con el tratamiento combinado TFD + Cloroquina.

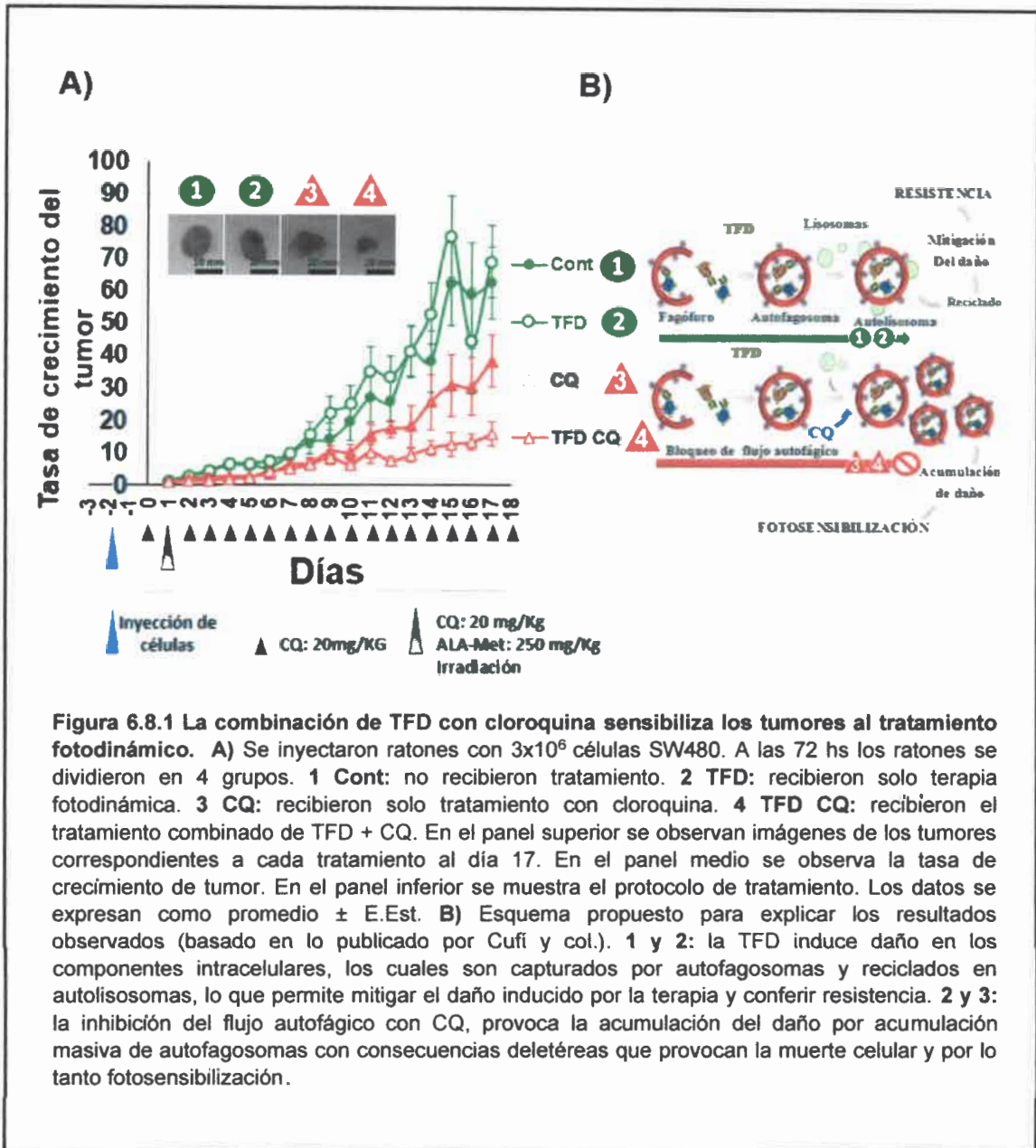


Figura 6.8.1 La combinación de TFD con cloroquina sensibiliza los tumores al tratamiento fotodinámico. A) Se inyectaron ratones con 3×10^6 células SW480. A las 72 hs los ratones se dividieron en 4 grupos. 1 Cont: no recibieron tratamiento. 2 TFD: recibieron solo terapia fotodinámica. 3 CQ: recibieron solo tratamiento con cloroquina. 4 TFD CQ: recibieron el tratamiento combinado de TFD + CQ. En el panel superior se observan imágenes de los tumores correspondientes a cada tratamiento al día 17. En el panel medio se observa la tasa de crecimiento de tumor. En el panel inferior se muestra el protocolo de tratamiento. Los datos se expresan como promedio \pm E.Est. B) Esquema propuesto para explicar los resultados observados (basado en lo publicado por Cufi y col.). 1 y 2: la TFD induce daño en los componentes intracelulares, los cuales son capturados por autofagosomas y reciclados en autolisosomas, lo que permite mitigar el daño inducido por la terapia y conferir resistencia. 2 y 3: la inhibición del flujo autofágico con CQ, provoca la acumulación del daño por acumulación masiva de autofagosomas con consecuencias deletéreas que provocan la muerte celular y por lo tanto fotosensibilización.

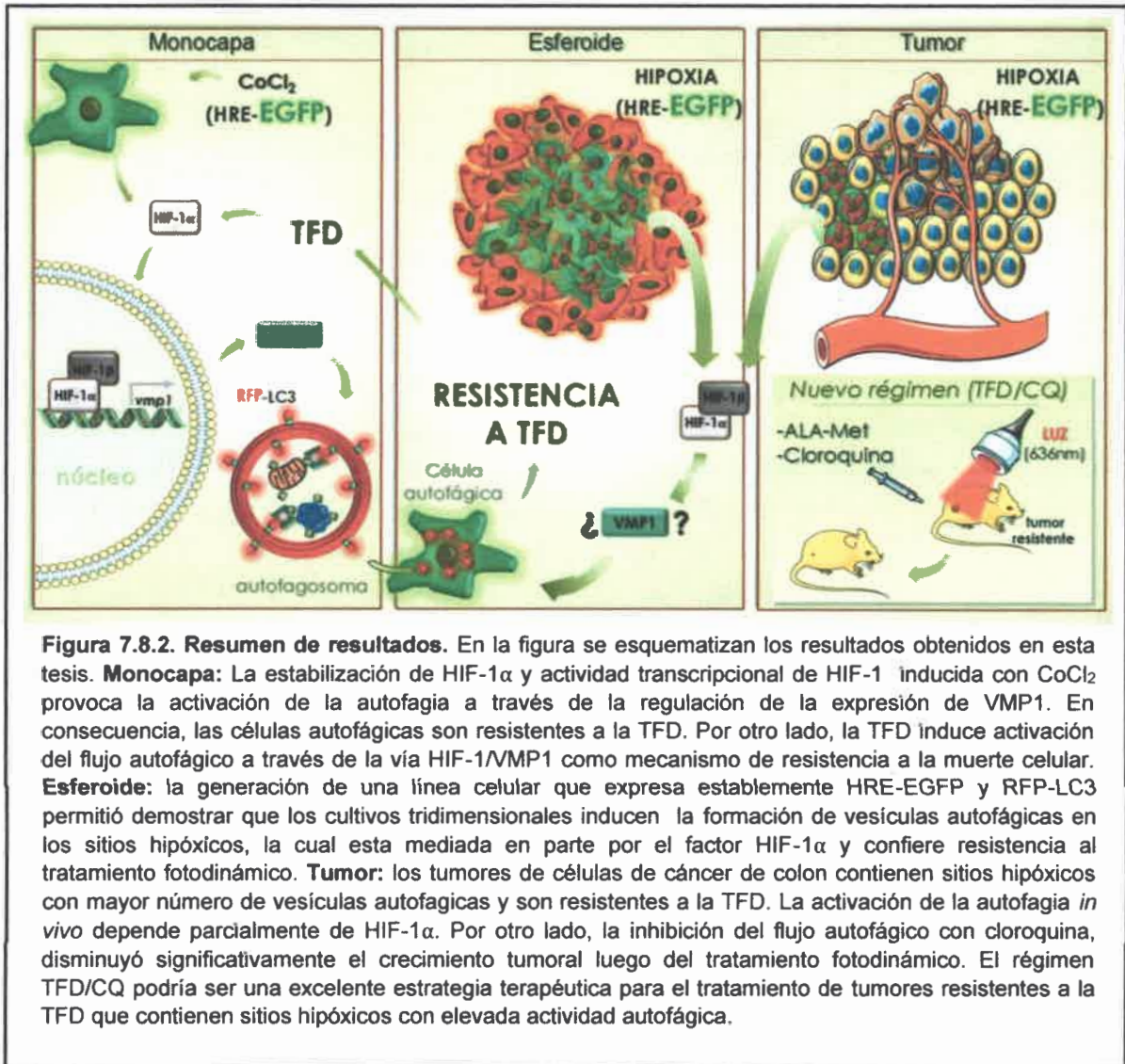
Estos resultados podrían interpretarse de la siguiente manera: los tumores de cáncer de colon utilizan la vía autofágica para promover su crecimiento, posiblemente como mecanismo que provee de fuentes bioenergéticas necesarias para la rápida proliferación en un microambiente estresante, lo cual además confiere resistencia a la TFD. Además como demostramos en el primer apartado, la TFD podría exacerbar la activación de esta vía celular promoviendo la progresión del tumor. **En este escenario, la combinación de TFD con la inhibición farmacológica del flujo autofágico, produce la acumulación de autofagosomas así como de sus sustratos, por lo tanto se promueve la acumulación aberrante de componentes (dañados por la TFD) no metabolizados,**

con consecuencias deletéreas (Ej. Muerte celular por apoptosis) en células tratadas, como resultado, los tumores se sensibilizan al tratamiento (Fig. 6.8.1 B).

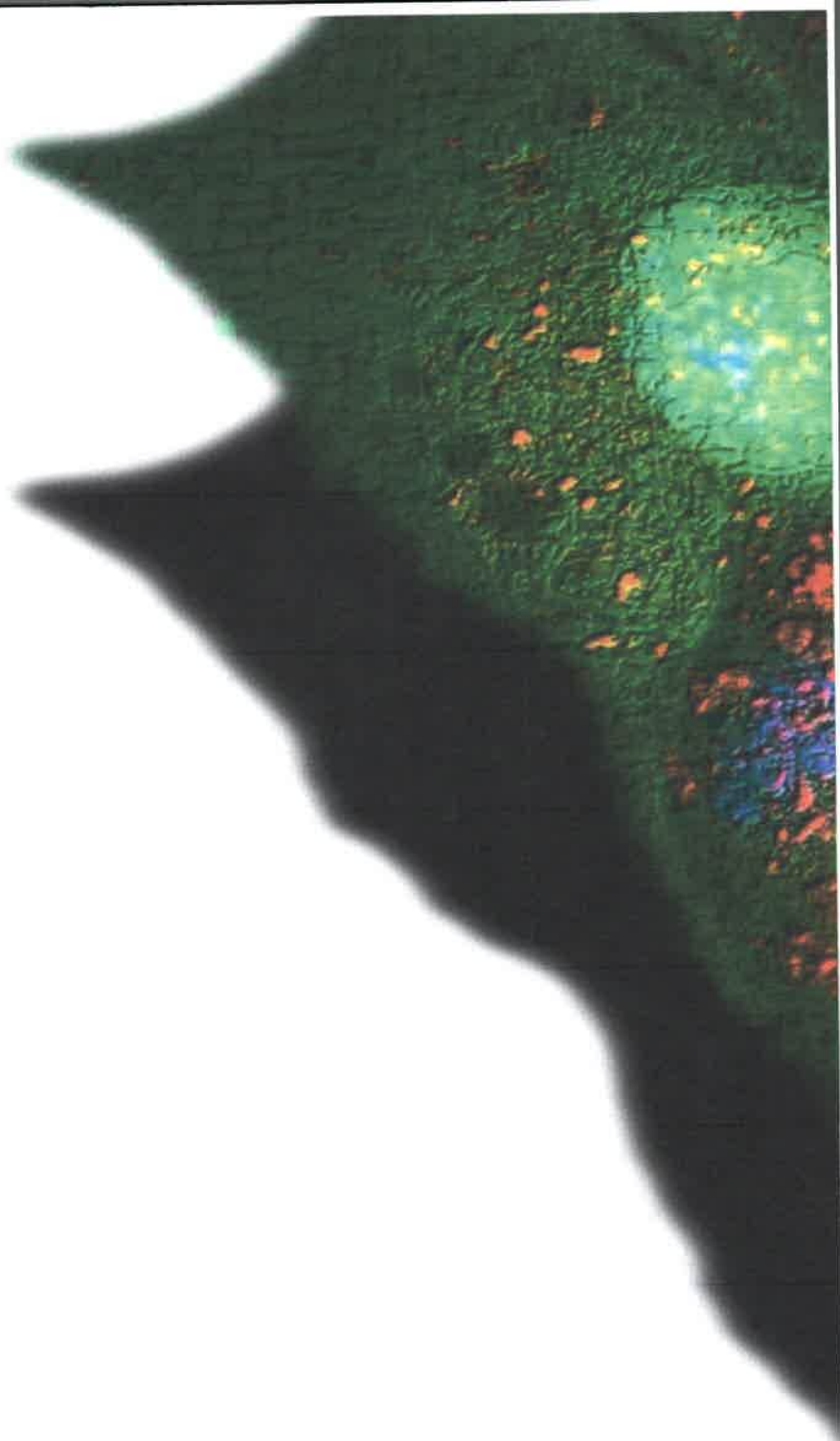
En el contexto de la TFD y el cáncer de colon, recientemente se ha propuesto un nuevo escenario que involucra la autofagia como blanco terapéutico. Aunque se considera que el rol de la autofagia como promotora del cáncer, se basa en su capacidad de mantener y suplir de nutrientes a células tumorales de rápido crecimiento, o en condiciones de estrés nutricional como en los sitios hipóxicos, en los últimos años se ha propuesto que la proliferación y progresión del tumor esta mediada por una subpoblación celular con características de células madres, llamadas células madres tumorales (CMTs). Si bien existen datos controversiales, se considera que las células madres tumorales podrían ser las responsables de la continua proliferación de un tumor *in vivo* (Seton-Rogers 2015). Curiosamente, Ming-Feng Wei y colaboradores, han demostrado que la capacidad de células madres tumorales de cáncer de colon de promover tumorigénesis, depende de la actividad autofágica (M.-F. Wei et al. 2014). Además, algunos reportes previos han demostrado que las CMTs son resistentes a la TFD, y podrían ser las responsables de la aparición de recidivas tumorales (Morgan et al. 2010). En este sentido, el grupo de trabajo de Ming-Feng Wei, demostró que el bloqueo de la autofagia, ya sea farmacológicamente (con cloroquina) o bloqueando la expresión de genes ATGs claves, revierte la resistencia a TFD de CMTs e inhibe su capacidad de generar tumores cuando son implantadas en ratones (M.-F. Wei et al. 2014). Estos resultados apoyan la idea de la combinación de TFD + inhibidor de autofagia, como estrategia terapéutica conveniente.

En síntesis, en la **Fig. 6.8.2** se resumen los resultados de esta tesis. Demostramos que la activación de la autofagia confiere resistencia a la TFD en los tres modelos de estudio empleados (2D, 3D e *in vivo*). Además, la activación de la autofagia en el contexto del microambiente tumoral esta mediada, al menos en parte, por la activación del factor HIF-1 en las regiones hipóxicas. Por otro lado, nuestros resultados obtenidos con el modelo 2D nos sugieren que éste mecanismo de resistencia puede ser exacerbado por la TFD, la cual induce autofagia dependiente de HIF-1/VMP1. Sin embargo, será necesario realizar futuros estudios con la finalidad de evaluar la implicancia de la vía HIF-1/VMP1 en el microambiente tumoral hipóxico, ya sea empleando modelos 3D o xenográficos. Por último, y confirmando nuestra hipótesis, la combinación de la terapia

fotodinámica con la inhibición de la autofagia, es un prometedor régimen de tratamiento que permitirá aumentar la eficiencia de la TFD en pacientes con tumores resistentes.



Nuestros resultados, podrían tener un fuerte impacto a nivel clínico ya que un régimen de tratamiento que involucre un inhibidor autofágico podría mejorar significativamente la respuesta a la terapia fotodinámica en tumores resistentes de cáncer de colon.



CONCLUSIONES

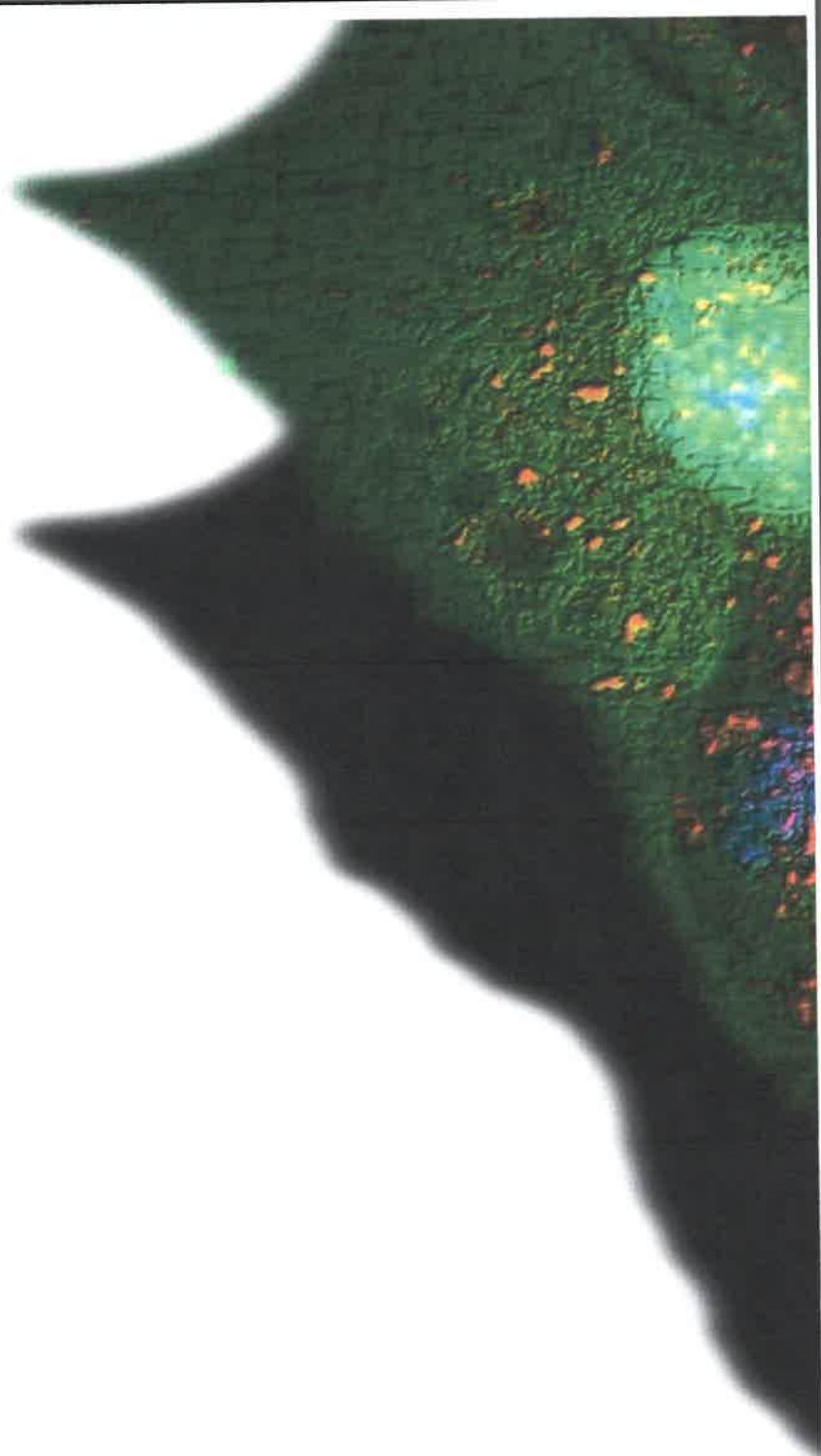
FINALES

CONCLUSIONES FINALES

- La activación de HIF-1 con CoCl_2 induce autofagia, la cual confiere resistencia a la Terapia Fotodinámica en células de cáncer de colon.
- HIF-1 induce autofagia a través de un nuevo mecanismo que involucra el reconocimiento de elementos HRE en el promotor del gen *vmp1*. La expresión de la proteína VMP1 es necesaria para la autofagia dependiente de HIF-1 α .
- La vía HIF-1/VMP1 es un nuevo mecanismo de activación de autofagia inducida por la Terapia Fotodinámica como vía de resistencia en células de cáncer de colon.
- Los cultivos tridimensionales inducen activación de flujo autofágico dependiente del tamaño, tiempo de formación y son resistentes a la TFD.
- Los cultivos tridimensionales tienen un centro hipóxico con células conteniendo un número elevado de vesículas autofágicas con respecto a células fuera del área hipóxica.
- La actividad autofágica de los cultivos tridimensionales depende parcialmente de HIF-1 α y confiere resistencia a la Terapia Fotodinámica.
- El bloqueo de HIF-1 α o el empleo de inhibidores farmacológicos de la autofagia sensibiliza a los cultivos tridimensionales al efecto citotóxico de la Terapia Fotodinámica.
- Los tumores de células de cáncer de colon generados en ratones inmunodeprimidos son resistentes a la Terapia Fotodinámica.

- Los tumores de células de cáncer de colon contienen sitios hipóxicos con elevado número de vesículas autofágicas.
- El bloqueo de HIF-1 α bloquea parcialmente el procesamiento de LC3 en tumores de cáncer de colon.
- La inhibición farmacológica de la autofagia empleando cloroquina sensibilizó los tumores de cáncer de colon al efecto de la Terapia Fotodinámica.

La activación de la autofagia, mediada por el microambiente tumoral hipóxico o inducido por la Terapia Fotodinámica confiere resistencia al tratamiento.



BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Agostinis, P. et al., 2011a. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), pp.250–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3209659&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 8, 2015].
- Agostinis, P. et al., 2011b. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians*, 61(4), pp.250–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617154> [Accessed May 1, 2012].
- Alberts, B. et al., 2002. alberts molecular biology of the cell - Books - NCBI. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/?term=alberts molecular biology of the cell](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/?term=alberts+molecular+biology+of+the+cell) [Accessed February 9, 2016].
- Alers, S. et al., 2012. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks. *Molecular and cellular biology*, 32(1), pp.2–11. Available at: <http://mcb.asm.org/content/32/1/2.full> [Accessed December 15, 2015].
- Allison, R.R., Mota, H.C. & Sibata, C.H., 2004. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 1(4), pp.263–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25048431> [Accessed February 9, 2016].
- Amaravadi, R.K. et al., 2011. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(4), pp.654–66. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3075808&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 28, 2016].
- Amaravadi, R.K. & Thompson, C.B., 2007. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(24), pp.7271–9. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094407> [Accessed March 9, 2012].
- Andrzejak, M., Price, M. & Kessel, D.H., 2011. Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells. *Autophagy*, 7(9), pp.979–84. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3210313&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2015].
- Anon, 2002. Autophagosome Formation in Mammalian Cells. Available at:
https://www.jstage.jst.go.jp/article/csf/27/6/27_6_421/_pdf [Accessed July 28, 2013].
- Anon, 2000. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/> [Accessed July 21, 2014].
- Anon, Xenograft Cancer Modeling from Invitek, Inc. | Pharmaceutical Outsourcing - The Journal of Pharmaceutical & Biopharmaceutical Contract Services. Available at: <http://www.pharmoutsourcing.com/25526-Xenograft-Tumor-Models-Xenograft-Model-Services/5822339-Xenograft-Cancer-Modeling/> [Accessed March 9, 2016].
- Ashburn, T.T. & Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature reviews. Drug discovery*, 3(8), pp.673–83. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1468> [Accessed July 16, 2014].
- Ashrafi, G. & Schwarz, T.L., 2012. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 20(1), pp.31–42. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3524633&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 5, 2015].
- Aznavoorian, S. et al., 1990. Signal transduction for chemotaxis and haptotaxis by matrix molecules in tumor cells. *The Journal of cell biology*, 110(4), pp.1427–38. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2116083&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].

- Barr, H. et al., 1991. Local eradication of rat colon cancer with photodynamic therapy: correlation of distribution of photosensitizer with biological effects in normal and tumour tissue. *Gut*, 32(5), pp.517–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1378929&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Barr, H. et al., 1990. The significance of the nature of the photosensitizer for photodynamic therapy: quantitative and biological studies in the colon. *British journal of cancer*, 62(5), pp.730–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1971516&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Bell, E.L. & Chandel, N.S., 2007. Mitochondrial oxygen sensing: regulation of hypoxia-inducible factor by mitochondrial generated reactive oxygen species. *Essays in biochemistry*, 43, pp.17–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17705790> [Accessed July 16, 2014].
- Bellot, G. et al., 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology*, 29(10), pp.2570–81. Available at: <http://mcb.asm.org/content/29/10/2570.full> [Accessed June 3, 2013].
- Bigelow, C.E. et al., 2001. ALA- and ALA-hexylester-induced protoporphyrin IX fluorescence and distribution in multicell tumour spheroids. *British journal of cancer*, 85(5), pp.727–34. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2364128&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 29, 2016].
- Bincoletto, C. et al., 2013. Interplay between apoptosis and autophagy, a challenging puzzle: new perspectives on antitumor chemotherapies. *Chemico-biological interactions*, 206(2), pp.279–88. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279713002536> [Accessed February 12, 2016].
- Bissell, M.J. et al., 2002. The organizing principle: microenvironmental influences in the normal and malignant breast. *Differentiation; research in biological diversity*,

- 70(9-10), pp.537–46. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933198&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- Bissell, M.J. & Radisky, D., 2001. Putting tumours in context. *Nature reviews. Cancer*, 1(1), pp.46–54. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2975572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2013].
- Bohensky, J. et al., 2007. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway. *Autophagy*, 3(3), pp.207–14. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17224629> [Accessed July 28, 2013].
- Bonello, S. et al., 2007. Reactive oxygen species activate the HIF-1 alpha promoter via a functional NFkappaB site. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 27(4), pp.755–61. Available at: <http://atvb.ahajournals.org/content/27/4/755.full> [Accessed February 11, 2016].
- Brech, A. et al., 2009. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Molecular oncology*, 3(4), pp.366–75. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789109000799> [Accessed December 16, 2015].
- Burgués Gasi6n, J.P. et al., 2005. [Cell cycle and apoptosis mechanisms implicated in intravesical chemotherapy resistances in superficial bladder cancer]. *Actas urol6gicas espa6olas*, 29(9), pp.846–59. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16353771> [Accessed July 28, 2013].
- Burman, C. & Ktistakis, N.T., 2010. Autophagosome formation in mammalian cells. *Seminars in immunopathology*, 32(4), pp.397–413. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20740284> [Accessed June 20, 2013].
- Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P., 2007. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et biophysica acta*, 1776(1), pp.86–107. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17693025> [Accessed June 2, 2015].
- Cairns, R.A. et al., 2007. Metabolic targeting of hypoxia and HIF1 in solid tumors can

- enhance cytotoxic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(22), pp.9445–50. Available at: <http://www.pnas.org/content/104/22/9445.abstract> [Accessed June 21, 2013].
- Carlsson, J. & Yuhas, J.M., 1984. Liquid-overlay culture of cellular spheroids. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progrès dans les recherches sur le cancer*, 95, pp.1–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6396753> [Accessed July 29, 2013].
- Carvalho, P. et al., 2004. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Review Literature And Arts Of The Americas*, 1704, pp.59–86.
- Casas, A. et al., 2011. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy. *Current medicinal chemistry*, 18(16), pp.2486–515. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21568910> [Accessed June 13, 2012].
- Chan, E.Y.W. et al., 2009. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Molecular and cellular biology*, 29(1), pp.157–71. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2612494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2015].
- Chen, N. & Karantza-Wadsworth, V., 2009. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(9), pp.1516–23. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155287&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2015].
- Chiche, J. et al., 2010. Hypoxic enlarged mitochondria protect cancer cells from apoptotic stimuli. *Journal of cellular physiology*, 222(3), pp.648–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19957303> [Accessed May 23, 2014].
- Christensen, T. et al., 1984. Multicellular spheroids as an in vitro model system for photoradiation therapy in the presence of Hpd. *Progress in clinical and biological research*, 170, pp.381–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6241686> [Accessed February 29, 2016].
- Chua, Y.L. et al., 2010. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha protein in hypoxia occurs independently of mitochondrial reactive oxygen species

- production. *The Journal of biological chemistry*, 285(41), pp.31277–84. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2951202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 20, 2016].
- Cogno, I.S. et al., 2011. Optimization of photodynamic therapy response by survivin gene knockdown in human metastatic breast cancer T47D cells. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 104(3), pp.434–43. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641815> [Accessed February 11, 2016].
- Copetti, T., Demarchi, F. & Schneider, C., 2009. p53/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy*, 5(6), pp.858–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458474> [Accessed July 28, 2013].
- Coutier, S. et al., 2001. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochemistry and photobiology*, 73(3), pp.297–303. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11281027> [Accessed March 1, 2016].
- Cufi, S. et al., 2013. The anti-malarial chloroquine overcomes primary resistance and restores sensitivity to trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *Scientific reports*, 3, p.2469. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3749547&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 5, 2016].
- Curry, P.M. & Levy, J.G., 1993. Stress protein expression in murine tumor cells following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *Photochemistry and photobiology*, 58(3), pp.374–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234472> [Accessed February 11, 2016].
- Danhier, P. et al., 2015. Combining Optical Reporter Proteins with Different Half-lives to Detect Temporal Evolution of Hypoxia and Reoxygenation in Tumors. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 17(12), pp.871–81. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4688563&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 5, 2016].
- Daniell, M.D. & Hill, J.S., 1991. A history of photodynamic therapy. *The Australian*

- and New Zealand journal of surgery*, 61(5), pp.340–8. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2025186> [Accessed February 9, 2016].
- David, H., 2014. Contribution of autophagy to the maintenance, invasion and metastasis of melanoma stem-like sub populations. | NC3Rs. Available at:
<https://www.nc3rs.org.uk/contribution-autophagy-maintenance-invasion-and-metastasis-melanoma-stem-sub-populations> [Accessed February 9, 2016].
- Davids, L.M. et al., 2009. Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy. *Cell biology international*, 33(10), pp.1065–72. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596456> [Accessed June 14, 2012].
- Degenhardt, K. et al., 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer cell*, 10(1), pp.51–64. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857533&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 11, 2012].
- DelNero, P. et al., 2015. 3D culture broadly regulates tumor cell hypoxia response and angiogenesis via pro-inflammatory pathways. *Biomaterials*, 55, pp.110–8. Available at:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961215003130> [Accessed February 10, 2016].
- Dewaele, M. et al., 2011a. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(6), pp.1402–14. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20626525> [Accessed March 13, 2012].
- Dewaele, M. et al., 2011b. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(6), pp.1402–14. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4373339&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 11, 2016].
- Diebold, I. et al., 2010. The hypoxia-inducible factor-2alpha is stabilized by oxidative

- stress involving NOX4. *Antioxidants & redox signaling*, 13(4), pp.425–36.
Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20039838> [Accessed July 29, 2013].
- Dini, L. et al., 2010. Rose bengal acetate photodynamic therapy-induced autophagy. *Cancer biology & therapy*, 10(10), pp.1048–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935508> [Accessed February 11, 2016].
- Dolmans, D.E.J.G.J., Fukumura, D. & Jain, R.K., 2003. Photodynamic therapy for cancer. *Nature reviews. Cancer*, 3(5), pp.380–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12724736> [Accessed January 5, 2015].
- Dougherty, T.J., 1993. PHOTODYNAMIC THERAPY. *Photochemistry and Photobiology*, 58(6), pp.895–900. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1993.tb04990.x> [Accessed January 24, 2016].
- Dougherty, T.J. et al., 1998. Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), pp.889–905.
- Durand, R. & Olive, P., 2001. Resistance of tumor cells to chemo- and radiotherapy modulated by the three dimensional architecture of solid tumors and spheroids. *Methods Cell Biol.*, 64, pp.211–233.
- Durand, R.E. & Sutherland, R.M., 1972. Effects of intercellular contact on repair of radiation damage. *Experimental Cell Research*, 71(1), pp.75–80. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482772902650> [Accessed February 29, 2016].
- Dusetti, N.J. et al., 2002. Cloning and expression of the rat vacuole membrane protein 1 (VMP1), a new gene activated in pancreas with acute pancreatitis, which promotes vacuole formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(2), pp.641–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11785947> [Accessed July 9, 2013].
- E et al., 2006. E SFEROIDES T UMORALES M ULTICELULARES EN LA E VALUACIÓN DE E STRATEGIAS T ERAPÉUTICAS A NTICANCEROSAS. , p.25 (4): 101–107. Available at:

http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2006/04/e_EsferoidesFcolorf.pdf [Accessed July 29, 2013].

- Edmondson, R. et al., 2014. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay and drug development technologies*, 12(4), pp.207–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026212&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 8, 2015].
- Eng, C.H. & Abraham, R.T., 2011. The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming. *Oncogene*, 30(47), pp.4687–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21666712> [Accessed March 9, 2012].
- Escudero, V. et al., 2001. Terapia fotodinámica tópica en el tratamiento de queratosis actínicas. *Servicio de Dermatología. Instituto Valenciano de Oncología (IVO). Valencia*. Available at: <http://www.elmedicointeractivo.com/ap1/emiold/publicaciones/dermacosmetica3/190-194.pdf> [Accessed February 9, 2016].
- Eskelinen, E.-L. et al., 2005. Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(11), pp.1058–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16190986> [Accessed July 28, 2013].
- Evans, C.L. et al., 2011. Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PloS one*, 6(8), p.e23434. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3158086&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].
- Fader, C.M. et al., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(12), pp.1901–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19781582> [Accessed May 25, 2013].
- Fang, Y., Tan, J. & Zhang, Q., 2015. Signaling pathways and mechanisms of hypoxia-induced autophagy in the animal cells. *Cell biology international*, 39(8), pp.891–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25808799> [Accessed February

- 2, 2016].
- Ferlay, J. et al., 2014. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 136(5), pp.E359–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> [Accessed September 25, 2014].
- Ferlay, J. et al., 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(12), pp.2893–917. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269> [Accessed July 23, 2013].
- Ferrario, A. et al., 2000. Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma. *Cancer research*, 60(15), pp.4066–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10945611> [Accessed June 14, 2012].
- Ferrario, A. & Gomer, C.J., 2010. Targeting the tumor microenvironment using photodynamic therapy combined with inhibitors of cyclooxygenase-2 or vascular endothelial growth factor. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 635, pp.121–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20552344> [Accessed February 9, 2016].
- Folkman, J., 2003. Fundamental concepts of the angiogenic process. *Current molecular medicine*, 3(7), pp.643–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14601638> [Accessed February 10, 2016].
- Folkman, J., 1990. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*, 82(1), pp.4–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1688381> [Accessed July 28, 2013].
- Foote, C.S., 1991. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and photobiology*, 54(5), p.659. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1798741> [Accessed February 9, 2016].
- Foster, T.H. et al., 1993. Fluence rate effects in photodynamic therapy of multicell tumor spheroids. *Cancer research*, 53(6), pp.1249–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8443805> [Accessed March 1, 2016].

- Fotinos, N. et al., 2006. 5-Aminolevulinic acid derivatives in photomedicine: Characteristics, application and perspectives. *Photochemistry and photobiology*, 82(4), pp.994–1015. Available at: <http://dx.doi.org/10.1562/2006-02-03-IR-794> [Accessed February 9, 2016].
- Fujita, N. et al., 2008. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure. *Molecular biology of the cell*, 19(11), pp.4651–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2575160&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Funderburk, S.F., Wang, Q.J. & Yue, Z., 2010. The Beclin 1-VPS34 complex--at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in cell biology*, 20(6), pp.355–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20356743> [Accessed June 9, 2013].
- Fung, C. et al., 2008. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Molecular biology of the cell*, 19(3), pp.797–806. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2262959&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Ganley, I.G. et al., 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), pp.12297–305. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2673298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2013].
- Gao, J.-L. & Chen, Y.-G., 2015. Natural compounds regulate glycolysis in hypoxic tumor microenvironment. *BioMed research international*, 2015, p.354143. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685782> [Accessed July 23, 2015].
- Gardner, L.B. et al., 2001. Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *The Journal of biological chemistry*, 276(11), pp.7919–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11112789> [Accessed February 3, 2016].

- Gaullier, J.M. et al., 1997. Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer research*, 57(8), pp.1481–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108449> [Accessed February 9, 2016].
- Goldberg, M.A. & Schneider, T.J., 1994. Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*, 269(6), pp.4355–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8308005> [Accessed July 23, 2015].
- González-Peramato, P., Regadera, J. & Juaranz, A., 2008. [Photodynamic therapy in urology. Biologic and pathologic mechanisms of action]. *Archivos españoles de urología*, 61(9), pp.1135–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19140598> [Accessed February 9, 2016].
- Gorski, S.M., Ries, J. & Lum, J.J., 2012. Targeting autophagy: the Achilles' heel of cancer. *Autophagy*, 8(8), pp.1279–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22836583> [Accessed March 5, 2016].
- Gozuacik, D. & Kimchi, A., 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, 23(16), pp.2891–906. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1207521> [Accessed January 24, 2016].
- Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, G.A., 1996. Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. , pp.4;379(6560):88–91.
- Granville, D.J. et al., 2000. Nuclear factor-kappaB activation by the photochemotherapeutic agent verteporfin. *Blood*, 95(1), pp.256–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607710> [Accessed February 11, 2016].
- Grasso, D. et al., 2009. Autophagy and VMP1 expression are early cellular events in experimental diabetes. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 9(1-2), pp.81–8. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1424390309800732> [Accessed July 20, 2014].
- Grasso, D. et al., 2011. Zymophagy, a novel selective autophagy pathway mediated by

- VMP1-USP9x-p62, prevents pancreatic cell death. *The Journal of biological chemistry*, 286(10), pp.8308–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3048716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 17, 2014].
- Green, D.R. & Wang, R., 2010. Calcium and energy: making the cake and eating it too? *Cell*, 142(2), pp.200–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20655464> [Accessed May 22, 2013].
- Gregorie, H.B. et al., 1968. Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. *Annals of surgery*, 167(6), pp.820–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1387148&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Grille, S.J. et al., 2003. The protein kinase Akt induces epithelial mesenchymal transition and promotes enhanced motility and invasiveness of squamous cell carcinoma lines. *Cancer research*, 63(9), pp.2172–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727836> [Accessed January 10, 2016].
- Guo, L. et al., 2012. Novel roles of Vmp1: inhibition metastasis and proliferation of hepatocellular carcinoma. *Cancer science*, 103(12), pp.2110–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22971212> [Accessed February 12, 2016].
- Guo, X.-Z. et al., 2015. Downregulation of VMP1 confers aggressive properties to colorectal cancer. *Oncology Reports*, 34(5), pp.2557–2566. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/or/34/5/2557/abstract> [Accessed February 12, 2016].
- Gwinn, D.M. et al., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30(2), pp.214–26. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2674027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 8, 2013].
- Hamblin, Michael R. Huang, Y.-Y., 2013. Handbook of Photomedicine: Amazon.es: Michael R. Hamblin, Ying-Ying Huang: Libros en idiomas extranjeros. Available at: <http://www.amazon.es/Handbook-Photomedicine-Michael-R-Hamblin/dp/1439884692> [Accessed July 18, 2015].

- Hanahan, D. & Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74. Available at: [http://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(11\)00127-9](http://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(11)00127-9) [Accessed July 12, 2012].
- Hara, T. et al., 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *The Journal of cell biology*, 181(3), pp.497–510. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2364687&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].
- Harris, A.L., 2002. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer*, 2(1), pp.38–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11902584> [Accessed May 23, 2013].
- Hayata, Y., 1982. Photoradiation. *Lasers in Diagnosis and Management*. Available at: <http://journal.publications.chestnet.org/data/Journals/CHEST/21517/332S.pdf> [Accessed February 9, 2016].
- He, C. & Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, pp.67–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2831538&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 8, 2015].
- Henderson, B.W. & Fingar, V.H., 1989. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochemistry and photobiology*, 49(3), pp.299–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2525260> [Accessed June 14, 2012].
- Herman, A.B., Savage, V.M. & West, G.B., 2011. A quantitative theory of solid tumor growth, metabolic rate and vascularization. N. Monk, ed. *PloS one*, 6(9), p.e22973. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0022973> [Accessed May 28, 2013].
- Hu, C. et al., 2008. The efficacy and selectivity of tumor cell killing by Akt inhibitors are substantially increased by chloroquine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(17), pp.7888–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18691894> [Accessed March 5, 2016].

- Hu, Y.-L. et al., 2012. Hypoxia-Induced Autophagy Promotes Tumor Cell Survival and Adaptation to Antiangiogenic Treatment in Glioblastoma. *Cancer Research*, 72(7), pp.1773–1783. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3319869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 26, 2015].
- Huang, J. & Klionsky, D.J., 2007. Autophagy and human disease. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(15), pp.1837–49. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671424> [Accessed July 28, 2013].
- Huygens, A. et al., 2003. Accumulation and photocytotoxicity of hypericin and analogs in two- and three-dimensional cultures of transitional cell carcinoma cells. *Photochemistry and photobiology*, 78(6), pp.607–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743871> [Accessed July 26, 2013].
- Ichinose, S. et al., 2006. Lysosomal cathepsin initiates apoptosis, which is regulated by photodamage to Bcl-2 at mitochondria in photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-s10 (Na). *International journal of oncology*, 29(2), pp.349–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16820876> [Accessed February 9, 2016].
- Infanger, D.W., Lynch, M.E. & Fischbach, C., 2013. Engineered culture models for studies of tumor-microenvironment interactions. *Annual review of biomedical engineering*, 15, pp.29–53. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-bioeng-071811-150028> [Accessed July 14, 2014].
- Iracheta, A.M., 2007. Cell suicide and cell death. *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fis. Nat. Esp)* 101, No 2. Available at: <http://www.celldeath-apoptosis.org/classics/about-apoptosis/lizarbe2007-eng.html> [Accessed February 9, 2016].
- Itakura, E. et al., 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Molecular biology of the cell*, 19(12), pp.5360–72. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2592660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].

- Itakura, E. & Mizushima, N., 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 6(6), pp.764–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 12, 2015].
- Ji, Z. et al., 2006. Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer letters*, 244(2), pp.182–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16427735> [Accessed July 29, 2013].
- Jiang, F. et al., 2004. Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains. *Photochemistry and photobiology*, 79(6), pp.494–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15291298> [Accessed February 9, 2016].
- Jin, S. & White, E., 2008. Tumor suppression by autophagy through the management of metabolic stress. *Autophagy*, 4(5), pp.563–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857579&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Jonker, J.W. et al., 2002. The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp.15649–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=137771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 15, 2015].
- Jung, S.-N. et al., 2008. Reactive oxygen species stabilize hypoxia-inducible factor-1 alpha protein and stimulate transcriptional activity via AMP-activated protein kinase in DU145 human prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29(4), pp.713–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18258605> [Accessed July 23, 2015].
- Kabeya, Y. et al., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO journal*, 19(21), pp.5720–8. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=305793&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 6, 2013].
- Kalos, M. & June, C.H., 2013. Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology. *Immunity*, 39(1), pp.49–60. Available at: <http://www.cell.com/article/S1074761313002860/fulltext> [Accessed July 13, 2014].
- Kamuhabwa, A.A.R., Huygens, A. & De Witte, P.A.M., 2003. Photodynamic therapy of transitional cell carcinoma multicellular tumor spheroids with hypericin. *International journal of oncology*, 23(5), pp.1445–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532989> [Accessed July 29, 2013].
- Kang, R. et al., 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell death and differentiation*, 18(4), pp.571–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3131912&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 9, 2012].
- Karantza-Wadsworth, V. et al., 2007. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & development*, 21(13), pp.1621–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1899472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 29, 2012].
- Kelekar, A., 2005. Autophagy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1066, pp.259–71. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533930> [Accessed February 9, 2016].
- Kennedy, J.C., Marcus, S.L. & Pottier, R.H., 1996. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA): mechanisms and clinical results. *Journal of clinical laser medicine & surgery*, 14(5), pp.289–304. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9612195> [Accessed February 9, 2016].
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H. & Pross, D.C., 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 6(1-2), pp.143–8.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121931> [Accessed January 28, 2016].

Kessel, D., 2006. Death pathways associated with photodynamic therapy. *Medical laser application : international journal for laser treatment and research*, 21(4), pp.219–224. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772082&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 17, 2015].

Kessel, D. & Castelli, M., 2001. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochemistry and photobiology*, 74(2), pp.318–22. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11547571> [Accessed June 13, 2012].

Khaitan, D. et al., 2006. Establishment and characterization of multicellular spheroids from a human glioma cell line; Implications for tumor therapy. *Journal of translational medicine*, 4(1), p.12. Available at: <http://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/1479-5876-4-12> [Accessed February 25, 2016].

Kim, H.R. et al., 1999. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer research*, 59(14), pp.3429–32. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10416606> [Accessed June 13, 2012].

Kim, J. et al., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), pp.132–41. Available at:

<http://dx.doi.org/10.1038/ncb2152> [Accessed September 22, 2015].

Kim, J. et al., 2006. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3(3), pp.177–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517405> [Accessed March 6, 2012].

Kinzler, K.W. & Vogelstein, B., 1998. Landscaping the cancer terrain. *Science (New York, N.Y.)*, 280(5366), pp.1036–7. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9616081> [Accessed July 28, 2013].

Klionsky, D.J., 2004. Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*, 431(7004),

- pp.31–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15343317> [Accessed July 28, 2013].
- Klionsky, D.J., 2005. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of cell science*, 118(Pt 1), pp.7–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1828869&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 26, 2016].
- Klionsky, D.J. & Emr, S.D., 2000. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science (New York, N.Y.)*, 290(5497), pp.1717–21. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2732363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 5, 2016].
- Kloek, J. & Beijersbergen van Henegouwen, 1996. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, 64(6), pp.994–1000. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8972644> [Accessed February 29, 2016].
- Kondo, A. et al., 2001. Hypoxia-induced enrichment and mutagenesis of cells that have lost DNA mismatch repair. *Cancer research*, 61(20), pp.7603–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606400> [Accessed June 13, 2012].
- Ktistakis, N.T., Andrews, S. & Long, J., 2011. What is the advantage of a transient precursor in autophagosome biogenesis? *Autophagy*, 7(1), pp.118–22. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20935487> [Accessed June 17, 2013].
- Kuma, A. et al., 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 277(21), pp.18619–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11897782> [Accessed June 9, 2013].
- Kung, C.-P. et al., 2011. Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 21(1), pp.71–100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3187613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Lamb, C.A., Yoshimori, T. & Tooze, S.A., 2013. The autophagosome: origins

- unknown, biogenesis complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(12), pp.759–74. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3696> [Accessed November 15, 2015].
- Lehnert, H. et al., 1996. Prevalence of dialysis-related amyloidosis in diabetic patients. Diabetes Amyloid Study Group. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 11(10), pp.2004–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918714> [Accessed July 28, 2013].
- Levine, B., 2005. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell*, 120(2), pp.159–62. Available at: <http://www.cell.com/article/S0092867405000437/fulltext> [Accessed February 7, 2016].
- Levine, B. & Klionsky, D.J., 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Developmental cell*, 6(4), pp.463–77. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15068787> [Accessed July 28, 2013].
- Levine, B., Sinha, S. & Kroemer, G., 2008. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. *Autophagy*, 4(5), pp.600–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2749577&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- Li, L., Chen, Y. & Gibson, S.B., 2013. Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular Signalling*, 25(1), pp.50–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000343> [Accessed October 1, 2015].
- Liang, C. et al., 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, 10(7), pp.776–87. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2878716&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 1, 2013].
- Liang, X.H. et al., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by

- beclin 1. *Nature*, 402(6762), pp.672–6. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10604474> [Accessed November 9, 2015].
- Lin, W. & Kuang, H., 2014. Oxidative stress induces autophagy in response to multiple noxious stimuli in retinal ganglion cells. *Autophagy*, 10(10), pp.1692–701. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4198355&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 10, 2016].
- Liu, X.-W. et al., 2010. HIF-1 α -dependent autophagy protects HeLa cells from fenretinide (4-HPR)-induced apoptosis in hypoxia. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 62(5), pp.416–25. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20637870> [Accessed June 13, 2012].
- Lodish, H. et al., 2000. *Molecular Cell Biology*. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21475/> [Accessed February 9, 2016].
- Lu, Y. et al., 2013. Two pore channel 2 (TPC2) inhibits autophagosomal-lysosomal fusion by alkalinizing lysosomal pH. *The Journal of biological chemistry*, 288(33), pp.24247–63. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3745369&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 25, 2016].
- Luna, M.C. & Gomer, C.J., 1991. Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer research*, 51(16), pp.4243–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1831066> [Accessed February 11, 2016].
- Luna, M.C., Wong, S. & Gomer, C.J., 1994. Photodynamic therapy mediated induction of early response genes. *Cancer research*, 54(5), pp.1374–80. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118827> [Accessed January 18, 2016].
- Ma, H. et al., 2012. Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Molecular imaging*, 11(6), pp.487–98. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23084249> [Accessed July 17, 2015].

- Ma, X.-H. et al., 2011. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(10), pp.3478–89. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096713&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 20, 2012].
- Madsen, S.J. et al., 2006. Multicell tumor spheroids in photodynamic therapy. *Lasers in surgery and medicine*, 38(5), pp.555–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16788918> [Accessed July 29, 2013].
- Madsen, S.J. et al., 2000. Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. *Photochemistry and photobiology*, 72(1), pp.128–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911737> [Accessed March 2, 2016].
- Maiuri, M.C. et al., 2009. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.87–93. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18806760> [Accessed May 29, 2013].
- Manalo, D.J. et al., 2005. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*, 105(2), pp.659–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15374877> [Accessed May 22, 2013].
- Mariño, G. & López-Otín, C., 2004. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 61(12), pp.1439–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197469> [Accessed May 30, 2013].
- Marxsen, J.H. et al., 2004. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) promotes its degradation by induction of HIF-alpha-prolyl-4-hydroxylases. *The Biochemical journal*, 381(Pt 3), pp.761–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133886&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- Maryam Mehrpour; Joëlle Botti; Patrice Codogno, 2011. Mechanisms and regulation of autophagy in mammalian cells. Available at:

<http://atlasgeneticsoncology.org/Deep/AutophagyID20102.html> [Accessed August 1, 2013].

Mathew, R., Kongara, S., et al., 2007. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes & development*, 21(11), pp.1367–81.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1877749&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 30, 2012].

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E., 2009. Assessing metabolic stress and autophagy status in epithelial tumors. *Methods in enzymology*, 453, pp.53–81.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857509&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed April 4, 2012].

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E., 2007. Role of autophagy in cancer.

Nature reviews. Cancer, 7(12), pp.961–7. Available at:

<http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n12/pdf/nrc2254.pdf> [Accessed July 29, 2013].

Mathews, M.S. et al., 2009. The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers in surgery and medicine*, 41(8), pp.578–84. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4153363&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 2, 2016].

Maycotte, P. et al., 2012. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy*, 8(2), pp.200–12. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3336076&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 29, 2016].

Mayer, A. & Wickner, W., 1997. Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF). *The Journal of cell biology*, 136(2), pp.307–17. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2134819&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].

- Mehta, G. et al., 2012. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 164(2), pp.192–204. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3436947&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 14, 2015].
- Menrad, H. et al., 2010. Roles of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) versus HIF-2alpha in the survival of hepatocellular tumor spheroids. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 51(6), pp.2183–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513003> [Accessed February 28, 2016].
- Milla Sanabria, L. et al., 2013. Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochimica et biophysica acta*, 1835(1), pp.36–45. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23046998> [Accessed May 28, 2013].
- Mitra, S. et al., 2006. Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Molecular cancer therapeutics*, 5(12), pp.3268–74.
- Mitra, S. & Foster, T.H., Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochemistry and photobiology*, 81(4), pp.849–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15807635> [Accessed March 1, 2016].
- Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), pp.2861–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006683> [Accessed May 23, 2013].
- Mizushima, N., 2004. Methods for monitoring autophagy. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), pp.2491–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15325587> [Accessed March 4, 2015].
- Mizushima, N. & Klionsky, D.J., 2007. Protein Turnover Via Autophagy: Implications for Metabolism*. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.nutr.27.061406.093749>

[Accessed February 9, 2016].

- Mizushima, N., Ohsumi, Y. & Yoshimori, T., 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell structure and function*, 27(6), pp.421–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12576635> [Accessed July 28, 2013].
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y., 2011. The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.107–32. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21801009> [Accessed July 10, 2014].
- Molejon, M.I. et al., 2013. The VMP1-Beclin 1 interaction regulates autophagy induction. *Scientific reports*, 3, p.1055. Available at: <http://www.nature.com/srep/2013/130111/srep01055/full/srep01055.html> [Accessed July 21, 2014].
- Morgan, J. et al., 2010. Substrate affinity of photosensitizers derived from chlorophyll-a: the ABCG2 transporter affects the phototoxic response of side population stem cell-like cancer cells to photodynamic therapy. *Molecular pharmaceutics*, 7(5), pp.1789–804. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3017217&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 5, 2016].
- Mroz, P. et al., 2011. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer. *Cancers*, 3(2), pp.2516–39. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3729395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 31, 2016].
- Nobukuni, T. et al., 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp.14238–43. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1242323&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- Novak, I. et al., 2010. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO reports*, 11(1), pp.45–51. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2816619&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Nowak, J. et al., 2009. The TP53INP2 protein is required for autophagy in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 20(3), pp.870–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2633384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 16, 2013].
- Nyström, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *The EMBO journal*, 24(7), pp.1311–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1142534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 4, 2012].
- Ogata, M. et al., 2003. Ca(2+)-dependent and caspase-3-independent apoptosis caused by damage in Golgi apparatus due to 2,4,5,7-tetrabromorhodamine 123 bromide-induced photodynamic effects. *Photochemistry and photobiology*, 78(3), pp.241–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14556310> [Accessed February 9, 2016].
- Ohnishi, K. et al., 2014. Plastic induction of CD133AC133-positive cells in the microenvironment of glioblastoma spheroids. *International Journal of Oncology*, 45(2), pp.581–586. Available at: <http://www.spandidos-publications.com/ijo/45/2/581/abstract> [Accessed February 24, 2016].
- Ohtani, H., 1998. Stromal reaction in cancer tissue: pathophysiologic significance of the expression of matrix-degrading enzymes in relation to matrix turnover and immune/inflammatory reactions. *Pathology international*, 48(1), pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9589457> [Accessed July 28, 2013].
- Al Okail, M.S., 2010. Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line. *Journal of Saudi Chemical Society*, 14(2), pp.197–201. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319610310000207> [Accessed July 16, 2014].
- Osada-Oka, M. et al., 2010. Glucose is necessary for stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α under hypoxia: contribution of the pentose phosphate pathway to this

- stabilization. *FEBS letters*, 584(14), pp.3073–9. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20621833> [Accessed March 3, 2016].
- Paggetti, J. et al., 2014. Hypoxia-induced autophagy in tumor cells: a key target for improving cancer immunotherapy. *Cancer Cell & Microenvironment*, 1(2). Available at: <http://www.smartscitech.com/index.php/CCM/article/view/213> [Accessed February 10, 2016].
- Palucka, K. & Banchereau, J., 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.265–77. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3258> [Accessed July 9, 2014].
- Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L., 2011. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell death & disease*, 2, p.e169. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3168993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2015].
- Papandreou, I. et al., 2006. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*, 3(3), pp.187–97. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16517406> [Accessed March 5, 2012].
- Pardo, R. et al., 2010. Gemcitabine induces the VMP1-mediated autophagy pathway to promote apoptotic death in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology: official journal of the International Association of Pancreatology (IAP) ... [et al.]*, 10(1), pp.19–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20299819> [Accessed February 12, 2016].
- Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), pp.927–39. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179260> [Accessed March 19, 2012].
- Peng, Y.-F. et al., 2013. Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PloS one*, 8(9), p.e74407. Available at:
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074407>
 [Accessed February 9, 2016].

- Pennacchietti, S. et al., 2003. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer cell*, 3(4), pp.347–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12726861> [Accessed July 6, 2015].
- Perona, R. & Sánchez-Pérez, I., 2004. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *British journal of cancer*, 90(3), pp.573–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2409594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Pietras, K. & Ostman, A., 2010. Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Experimental cell research*, 316(8), pp.1324–31. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20211171> [Accessed May 29, 2014].
- Piret, J.-P. et al., 2002. Is HIF-1 alpha a pro- or an anti-apoptotic protein? *Biochemical pharmacology*, 64(5-6), pp.889–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213583> [Accessed February 24, 2016].
- Proikas-Cezanne, T. & Codogno, P., 2011. Beclin 1 or not Beclin 1... *Autophagy*, 7(7), pp.671–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21301208> [Accessed July 28, 2013].
- Punnonen, E.L. et al., 1992. Autophagy, cathepsin L transport, and acidification in cultured rat fibroblasts. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 40(10), pp.1579–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326577> [Accessed July 28, 2013].
- Qian, Q. et al., 2014. VMP1 related autophagy and apoptosis in colorectal cancer cells: VMP1 regulates cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(3), pp.1041–1047. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24365149> [Accessed January 6, 2016].
- Qiu, W. et al., 2014. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. *Cell death & disease*, 5, p.e1123. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.84> [Accessed February 25, 2016].
- Rabinowitz, J.D. & White, E., 2010. Autophagy and metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 330(6009), pp.1344–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3010857&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- rez&rendertype=abstract [Accessed May 21, 2013].
- Reichert, J.M., 2003. Trends in development and approval times for new therapeutics in the United States. *Nature reviews. Drug discovery*, 2(9), pp.695–702. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12951576> [Accessed February 22, 2016].
- Reiners, J.J. et al., 2010. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*, 6(1), pp.7–18. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2861993&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 13, 2012].
- Ropolo, A. et al., 2007. The pancreatitis-induced vacuole membrane protein 1 triggers autophagy in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, 282(51), pp.37124–33. Available at: <http://www.jbc.org/content/282/51/37124> [Accessed July 28, 2013].
- Rosenkranz, A.A., Jans, D.A. & Sobolev, A.S., 2000. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunology and cell biology*, 78(4), pp.452–64. Available at: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00925.x> [Accessed March 1, 2016].
- Ruhdorfer, S. et al., 2007. Gene expression profiling of the human carcinoma cell line A-431 after 5-aminolevulinic acid-based photodynamic treatment. *International journal of oncology*, 30(5), pp.1253–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17390029> [Accessed February 11, 2016].
- Rumie Vittar, N.B. et al., 2013. Ecological photodynamic therapy: new trend to disrupt the intricate networks within tumor ecosystem. *Biochimica et biophysica acta*, 1835(1), pp.86–99. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127970> [Accessed June 27, 2013].
- Sahin, A.A. et al., 1991. Tumor proliferative fraction in solid malignant neoplasms. A comparative study of Ki-67 immunostaining and flow cytometric determinations. *American journal of clinical pathology*, 96(4), pp.512–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1716414> [Accessed March 3, 2016].
- Salceda, S. & Caro, J., 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions.

- Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *The Journal of biological chemistry*, 272(36), pp.22642–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278421> [Accessed June 13, 2012].
- Sancak, Y. et al., 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, 141(2), pp.290–303. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3024592&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 24, 2013].
- Santini, M.T. & Rainaldi, G., 1999. Three-dimensional spheroid model in tumor biology. *Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 67(3), pp.148–57. Available at: <http://www.karger.com/Article/FullText/28065> [Accessed July 17, 2015].
- Sarkar, C. et al., 2014. Impaired autophagy flux is associated with neuronal cell death after traumatic brain injury. *Autophagy*, 10(12), pp.2208–22. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/15548627.2014.981787> [Accessed February 25, 2016].
- Sato, T.K., Darsow, T. & Emr, S.D., 1998. Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Molecular and cellular biology*, 18(9), pp.5308–19. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=109116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 18, 2013].
- Savina, A. et al., 2005. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 6(2), pp.131–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15634213> [Accessed June 16, 2013].
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., et al., 2007. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO journal*, 26(7), pp.1749–60. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1847657&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 13, 2012].

- Scherz-Shouval, R., Shvets, E. & Elazar, Z., 2007. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy. *Autophagy*, 3(4), pp.371–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438362> [Accessed February 11, 2016].
- Schofield, C.J. & Ratcliffe, P.J., 2005. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), pp.617–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16139242> [Accessed April 18, 2012].
- Semenza, G.L., 2001. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell*, 107(1), pp.1–3. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11595178> [Accessed July 28, 2013].
- Semenza, G.L., 2004. Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 19, pp.176–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15304631> [Accessed July 16, 2014].
- Seton-Rogers, S., 2015. Cancer stem cells: Different in the details. *Nature Reviews Cancer*, 15(10), pp.574–574. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc4022> [Accessed March 8, 2016].
- Sharman, W., Allen, C. & van Lier JE, 1999. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug discovery today*, 4(11), pp.507–517. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10529768> [Accessed February 9, 2016].
- Sharman, W.M., Allen, C.M. & van Lier, J.E., 2000. Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods in enzymology*, 319, pp.376–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10907528> [Accessed January 24, 2016].
- Shi, R.-Y. et al., 2014. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke. *CNS neuroscience & therapeutics*, 20(12), pp.1045–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25230377> [Accessed February 10, 2016].
- Sibata, C.H. et al., 2001. Photodynamic therapy in oncology. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 2(6), pp.917–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585008> [Accessed February 9, 2016].

- Sieroń, A. et al., 2003. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied delta-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 32(6), pp.330–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12787039> [Accessed June 13, 2012].
- Simonsen, A. & Tooze, S.A., 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology*, 186(6), pp.773–82. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2753151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].
- Solomon, V.R. & Lee, H., 2009. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies. *European journal of pharmacology*, 625(1-3), pp.220–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19836374> [Accessed March 5, 2016].
- Stockler, M. et al., 2000. Systematic reviews of chemotherapy and endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Cancer treatment reviews*, 26(3), pp.151–68. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10814559> [Accessed February 9, 2016].
- Stukavec, J. et al., 2009. Photodynamic therapy of human colorectal carcinoma cell line. *Photomedicine and laser surgery*, 27(1), pp.107–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687057> [Accessed February 9, 2016].
- Stummer, W. et al., 2014. 5-Aminolevulinic acid-derived tumor fluorescence: the diagnostic accuracy of visible fluorescence qualities as corroborated by spectrometry and histology and postoperative imaging. *Neurosurgery*, 74(3), pp.310–9; discussion 319–20. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4206350&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed January 17, 2016].
- Sun, Y. et al., 2015. Hypoxia-induced autophagy reduces radiosensitivity by the HIF-1 α /miR-210/Bcl-2 pathway in colon cancer cells. *International journal of oncology*, 46(2), pp.750–6. Available at:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25385144> [Accessed November 8, 2015].
- Sutherland, R.M. et al., 1979. Resistance to adriamycin in multicellular spheroids. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 5(8), pp.1225–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/528267> [Accessed February 29, 2016].
- Szeimies, R.M. et al., 2002. Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 47(2), pp.258–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12140473> [Accessed February 9, 2016].
- Taguchi-Atarashi, N. et al., 2010. Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 11(4), pp.468–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20059746> [Accessed February 9, 2016].
- Takahashi, Y. et al., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(10), pp.1142–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2254521&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 22, 2013].
- Tanida, I. et al., 2002. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *The Journal of biological chemistry*, 277(16), pp.13739–44. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825910> [Accessed July 28, 2013].
- Tannock, I.F. et al., 2002. Limited Penetration of Anticancer Drugs through Tumor Tissue: A Potential Cause of Resistance of Solid Tumors to Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.*, 8(3), pp.878–884. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/3/878.full> [Accessed July 29, 2013].
- Tannock, I.F., 1968. The relation between cell proliferation and the vascular system in a transplanted mouse mammary tumour. *British journal of cancer*, 22(2), pp.258–73.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2008239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].

- Tian, Y. et al., 2010. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell*, 141(6), pp.1042–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20550938> [Accessed November 8, 2015].
- Tong, J., Yan, X. & Yu, L., 2010. The late stage of autophagy: cellular events and molecular regulation. *Protein & cell*, 1(10), pp.907–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204017> [Accessed February 9, 2016].
- Tracy, K. & Macleod, K.F., 2010. Regulation of mitochondrial integrity, autophagy and cell survival by BNIP3. *Autophagy*, 3(6), pp.616–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2989881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- Trédan, O. et al., 2007. Drug resistance and the solid tumor microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(19), pp.1441–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17895480> [Accessed March 6, 2012].
- Trotter, M.J., Acker, B.D. & Chaplin, D.J., 1989. Histological evidence for nonperfused vasculature in a murine tumor following hydralazine administration. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 17(4), pp.785–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2777668> [Accessed July 28, 2013].
- Vaccaro, M.I. et al., 2008. A novel mammalian trans-membrane protein reveals an alternative initiation pathway for autophagy. *Autophagy*, 4(3), pp.388–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18253086> [Accessed July 14, 2014].
- Valentijn, A.J., Zouq, N. & Gilmore, A.P., 2004. Anoikis. *Biochemical Society transactions*, 32(Pt3), pp.421–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15157151> [Accessed July 28, 2013].
- Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), pp.1–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16430879> [Accessed March 10, 2012].

- Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P., 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research*, 49(23), pp.6449–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2684393> [Accessed July 28, 2013].
- Wang, C.-W. & Klionsky, D.J., The molecular mechanism of autophagy. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 9(3-4), pp.65–76. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1430730&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].
- WARBURG, O., 1956. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), pp.309–14. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13298683> [Accessed August 4, 2012].
- Warfel, N.A. & El-Deiry, W.S., 2014. HIF-1 signaling in drug resistance to chemotherapy. *Current medicinal chemistry*, 21(26), pp.3021–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24735366> [Accessed February 10, 2016].
- Wei, B., Yue, P. & Qingwei, L., 2014. [The molecular mechanism of necroptosis]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji*, 36(6), pp.519–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929509> [Accessed February 9, 2016].
- Wei, L.-H., Chou, C.-H. & Su, J.-L., 2004. Hypoxia-inducible factor- 1 α (HIF-1/spl alpha) and photodynamic therapy. In *The Second Asian and Pacific Rim Symposium on Biophotonics, 2004. APBP 2004*. IEEE, pp. 88–88. Available at: <http://ieeexplore.ieee.org/articleDetails.jsp?arnumber=1412292> [Accessed March 9, 2016].
- Wei, M.-F. et al., 2014. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy*, 10(7), pp.1179–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4203546&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 13, 2015].
- Weidberg, H. et al., 2011. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis. *Developmental cell*, 20(4),

- pp.444–54. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21497758>
[Accessed February 9, 2016].
- Weijer, R. et al., 2015. Inhibition of hypoxia inducible factor 1 and topoisomerase with acriflavine sensitizes perihilar cholangiocarcinomas to photodynamic therapy. *Oncotarget*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26657503>
[Accessed February 8, 2016].
- Wenger, R.H., Stiehl, D.P. & Camenisch, G., 2005. Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*, 2005(306), p.re12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16234508>
[Accessed July 10, 2014].
- West, C.M., 1989. Size-dependent resistance of human tumour spheroids to photodynamic treatment. *British journal of cancer*, 59(4), pp.510–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2247149&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].
- West, C.M. & Moore, J. V, 1992. Mechanisms behind the resistance of spheroids to photodynamic treatment: a flow cytometry study. *Photochemistry and photobiology*, 55(3), pp.425–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1532855> [Accessed July 29, 2013].
- West, C.M., Sandhu, R.R. & Stratford, I.J., 1984. The radiation response of V79 and human tumour multicellular spheroids--cell survival and growth delay studies. *British journal of cancer*, 50(2), pp.143–51. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1976873&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 29, 2016].
- West, C.M. & Sutherland, R.M., 1987. The radiation response of a human colon adenocarcinoma grown in monolayer, as spheroids, and in nude mice. *Radiation research*, 112(1), pp.105–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3659291> [Accessed July 29, 2013].
- White, E., 2012. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(6), pp.401–10. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3664381&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

rez&rendertype=abstract [Accessed July 10, 2014].

Wiesner, J. et al., 2003. New antimalarial drugs. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 42(43), pp.5274–93. Available at:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613157> [Accessed March 5, 2016].

Wilkinson, S. et al., 2009. Hypoxia-selective macroautophagy and cell survival signaled by autocrine PDGFR activity. *Genes & development*, 23(11), pp.1283–8. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2701580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2015].

Wyld, L., Reed, M.W. & Brown, N.J., 1998. The influence of hypoxia and pH on aminolaevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro. *British journal of cancer*, 77(10), pp.1621–7. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2150064&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 1, 2016].

Xia, X. et al., 2009. Integrative analysis of HIF binding and transactivation reveals its role in maintaining histone methylation homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), pp.4260–5.

Available at: <http://www.pnas.org/content/106/11/4260.long> [Accessed February 8, 2016].

Xu, Y., Xia, X. & Pan, H., 2013. Active autophagy in the tumor microenvironment: A novel mechanism for cancer metastasis. *Oncology letters*, 5(2), pp.411–416.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3573143&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 9, 2016].

Yang, Z. et al., 2006. Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Molecular biology of the cell*, 17(12), pp.5094–104.

Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1679675&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 28, 2013].

Yang, Z.J. et al., 2011. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications.

- Molecular cancer therapeutics*, 10(9), pp.1533–41. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3170456&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 17, 2014].
- Yoo, J.-O. & Ha, K.-S., 2012. New insights into the mechanisms for photodynamic therapy-induced cancer cell death. *International review of cell and molecular biology*, 295, pp.139–74. Available at:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22449489> [Accessed November 6, 2015].
- Yue, Z. et al., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp.15077–82. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=299911&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 24, 2016].
- Zhang, C. et al., 2013. Calyxin Y induces hydrogen peroxide-dependent autophagy and apoptosis via JNK activation in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. *Cancer letters*, 340(1), pp.51–62. Available at:
<http://www.cancerletters.info/article/S0304383513004710/fulltext> [Accessed February 11, 2016].
- Zhang, H. et al., 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *The Journal of biological chemistry*, 283(16), pp.10892–903. Available at:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2447655&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 6, 2013].
- Zhang, X. et al., 2014. Induction of mitochondrial dysfunction as a strategy for targeting tumour cells in metabolically compromised microenvironments. *Nature communications*, 5, p.3295. Available at:
<http://www.nature.com/ncomms/2014/140218/ncomms4295/full/ncomms4295.html> [Accessed February 29, 2016].
- Zhou, Y. et al., 2014. Autophagy inhibits chemotherapy-induced apoptosis through downregulating Bad and Bim in hepatocellular carcinoma cells. *Scientific reports*,

4, p.5382. Available at:

<http://www.nature.com/srep/2014/140620/srep05382/full/srep05382.html>

[Accessed February 12, 2016].