



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Evaluación de MicroRNAs involucrados al proceso de autofagia
inducida farmacológicamente en una línea celular de cáncer
colorrectal.**

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

Presenta:

Rebeca Salgado García

Director de Tesis: Dra. Nadia Judith Jacobo Herrera

Los Reyes Iztacala. Edo. De México, 201





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dedicataria:

A Maricela y Marcos por ser el motor que me impulsa a seguir esforzándome y a ser mejor persona día a día.

Agradecimientos

A Maricela por ser la mejor madre del mundo y siempre apoyarme y aconsejarme en todos los momentos importantes de mi vida. Por estar a mi lado desde siempre y guiarme con sabiduría a lo largo de mi vida.

A Marcos por ser una persona muy importante en mi vida y el mejor padre. Por apoyarme en todas las decisiones que he tomado hasta ahora.

A Abraham, el mejor hermano que la vida me dio. Gracias por ser mi confidente y mejor amigo que siempre estuvo escuchándome cuando más lo necesitaba.

A Yael y Keyla por ser las mejores amigas del mundo. Por estar a mi lado a lo largo de la carrera y por darme un sinfín de momentos divertidos.

A Lu, la mejor amiga y hermana que pude haber conocido a lo largo de la carrera. Gracias por escucharme y apoyarme siempre a pesar de que somos completamente diferentes, sin embargo, es por eso que todos los momentos que pasamos incluso los momentos tristes fueron divertidos e inolvidables.

A Luisa, Jossimar, Izamary, Osvaldo, Carlingui, Oliver, Víctor, Sandy, Alexia y Pablo por hacerme pasar momentos llenos de diversión y de mucha risa. Por ser los mejores compañeros de trabajo

que pude haber tenido y aceptarme tal y como soy. Los quiero. Arriba Oncobabys!!.

A la Dra. Nadia por ser una gran y maravillosa tutora que me ha guiado con gran sabiduría y apoyado desde el inicio de mi entrada al laboratorio y por enseñarme un sinfín de cosas que nunca olvidare a lo largo de mi vida.

Al Dr. Carlos por aceptarme en su grupo de trabajo y por darme su apoyo incondicional a lo largo de la elaboración de mi proyecto de investigación. Por tomarme en cuenta siempre y enseñarme parte de sus conocimientos como investigador.

A Verito, el Dr. Lalo y la Dra. Gaby por ser los mejores tutores que he tenido, aparte de guiarme y enseñarme todas las técnicas de biología molecular que se hasta el momento. Gracias por sus regaños y observaciones ya que eso me ha ayudado a crecer como investigadora y persona. Los admiro!.

Índice

1.- RESUMEN	9
2.- Introducción.....	11
2.1- Cáncer	11
2.2- Cáncer Colorrectal	14
2.3- MicroRNAs y Cáncer Colorrectal	16
2.4- Biogénesis de los MicroRNAs.....	17
2.5- Autofagia.....	19
2.5.1- Autofagia y MicroRNAs.....	19
2.6- Metabolismo del cáncer y Autofagia	21
2.7- Tratamientos farmacológicos para Cáncer Colorrectal	23
2.7.1- Doxorrubicina	23
2.7.2- Metformina.....	25
2.7.3- Oxamato de Sodio	28
3.- Justificación.....	30
4.- Hipótesis	31
5.- Objetivos	31
6.- Material y Métodos.....	32
6.1- Cultivo celular	32
6.2- Determinación de la CI_{50} de la línea celular HCT116.....	32
6.3- Análisis de la expresión de MicroRNAs	35
6.3.1- Extracción de RNA	35
6.3.2- Retrotranscriptasa	35
6.3.3- qRT-PCR.....	36

6.4- Extracción de Proteínas	37
6.5- Western Blot	38
7.- Resultados	40
7.1 Evaluación citotóxica de los fármacos	40
7.2 Expresión Relativa de MicroRNAs involucrados en el proceso de autofagia	44
7.3 Detección de proteínas involucradas en la autofagia	46
8.-Discusión.....	51
9.-Conclusiones.....	57
10.-Referencias	58

Lista de Figuras

Figura 1: “Hallamarks del cáncer” o características distintivas adquiridas para la progresión de una célula normal a una célula tumoral o cancerígena.....	13
Figura 2: Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial (Tasa por cada 100,000 personas).....	15
Figura 3: Biogénesis de MicroRNAs.....	18
Figura 4: Regulación del proceso de autofagia por miRNAs.....	21
Figura 5: Estructura química de la Doxorrubicina: C27H29NO11.....	25
Figura 6: Efectos de la Metformina en las células cancerosas.....	27

Figura 7: Estructura química del Oxamato de sodio: C ₂ H ₂ NNaO ₃	29
Figura 8: Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los fármacos individuales A) Doxorrubicina; B) Oxamato; C) Metformina en la línea celular HCT116 a 24h de exposición con el estímulo.	41
Figura 9.- Concentración Inhibitoria 50 (CI ₅₀) de los fármacos en combinación a 24 h de exposición al fármaco en la línea celular HCT116 de CCR. Met (mM), Ox (mM), Dox (µM).	43
Figura 10.- Expresión relativa de miR 106a a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).	45
Figura 11.- Expresión relativa de miR 101 a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).	45
Figura 12.- Expresión relativa de miR 183 a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).	46
Figura 13.- Detección de la proteína ULK1 (A) mediante Western Blot a 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.....	47
Figura 14.- Detección de la proteína ATG4b mediante Western Blot. (B) 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.....	48
Figura 15.- Detección de la proteína LC3 I y II mediante Western Blot. (C) 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.....	50

Lista de Tablas

Tabla 1: Concentraciones de las combinaciones de los fármacos utilizados para el ensayo de Sulforodamina B (SFR-B) en la línea celular HCT116 de CCR.	34
Tabla 2: Condiciones de pre-amplificación para generar cDNA de la línea celular HCT116 de CCR expuesta a 4 tiempos de exposición a los fármacos.....	36
Tabla 3: Condiciones de amplificación para los diferentes miRNAs involucrados en el proceso de autofagia.....	37
Tabla 4. Listado de anticuerpos utilizados para Westen Blot para la detección de autofagia en la línea celular HCT116.	39

1.- RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es un problema de salud a nivel mundial con alta incidencia y mortalidad en ambos sexos, aproximadamente 25.600 nuevos casos son diagnosticados cada año. Investigaciones anteriores han demostrado que el inicio y progresión del CCR puede estar asociado con la desregulación de los microRNAs, los cuales juegan un papel importante en la regulación de diversos procesos biológicos como la apoptosis y la autofagia. La autofagia es un proceso evolutivamente conservado de múltiples pasos en donde la célula degrada sus proteínas de larga vida y organelos dañados. Nuestro grupo de investigación estuvo interesado en estudiar la inducción de este proceso en la línea celular humana de cáncer colorrectal HCT-116 mediante la combinación de tres fármacos: Metformina y Oxamato de Sodio, inhibidores de mTOR y glicólisis respectivamente, en sinergia con Doxorrubicina que es un quimioterapéutico convencional para diferentes tipos de cáncer como mama y colorrectal. El objetivo principal de este proyecto fue evaluar microRNAs involucrados en el proceso de autofagia inducida farmacológicamente por la combinación de los tres fármacos en esta línea celular.

Se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los fármacos individuales y en combinación mediante el ensayo colorimétrico de la Sulforodamina B (SFR-B), mostrando una concentración inhibitoria subóptima de los tres fármacos en combinación (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio). Posteriormente se evaluaron los niveles de expresión relativa de miR-101, miR-183 y miR-106a involucrados en la autofagia, mostrando una modificación de la expresión de estos

genes en la línea celular expuesta a los tratamientos en los diferentes tiempos, así como también se observó la detección de las proteínas esenciales involucradas en este mismo proceso de muerte celular.

En conclusión, el presente trabajo nos proporcionará información detallada sobre los procesos de modulación de las redes de señalización autofágica y de sus miRNAs involucrados tales como miR 106a, miR 183 y miR 101 que permitan proponer mejores y eficaces estrategias terapéuticas contra el CCR y probablemente otros tipos de cáncer.

2.- Introducción

2.1- Cáncer

El cáncer es una enfermedad de múltiples etapas caracterizada por la interrupción del equilibrio homeostático entre la proliferación y la muerte celular, lo cual deriva en una alta tasa proliferativa, resistencia a la apoptosis, metástasis y la supervivencia celular, lo que conlleva a la formación de tumores (Parasramka et al., 2012). Es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y se le atribuyeron más de 8.2 millones de defunciones en el 2012 (Ferlay et al., 2012). En el Informe de la OMS sobre la situación mundial del cáncer, se abordan varios factores de riesgo para el desarrollo de dicho padecimiento, incluyendo el alto consumo de alcohol, tabaquismo, poca actividad física y dieta no saludable. Sin embargo, el cáncer es mucho más heterogéneo que otras enfermedades, un buen ejemplo es la enfermedad denominada poliposis adenomatosa familiar, que causa aproximadamente el 16% de todos los tipos de cáncer a nivel mundial (Vineis, 2014).

La investigación sobre el cáncer ha revelado que es una enfermedad que implica cambios dinámicos en el genoma que involucran la progresión de una serie de eventos, tales como autosuficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a las señales inhibitoras de crecimiento, evasión de la apoptosis, potencial replicativo ilimitado, angiogénesis, metástasis, inestabilidad genómica, desregulación del metabolismo celular, inflamación continua promotora de tumores y evasión de la

respuesta inmunológica (Figura 1), lo que provoca la conversión de una célula normal a una tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000).

Actualmente, las terapias que se utilizan en pacientes con cáncer consisten en cirugía, quimioterapia y radioterapia. Sin embargo, los agentes utilizados en la quimioterapia provocan serios efectos secundarios como, por ejemplo, la radioresistencia y la citotoxicidad. Es por eso que hoy en día un gran número de estudios se centran en la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento dirigidas a las características distintivas del cáncer, así como en el uso de terapias combinatorias que puedan bloquear de manera simultánea múltiples objetivos involucrados en procesos biológicos. Ejemplo de ello son las proteínas involucradas en vías como la glucólisis (Lactato Deshidrogenasa A ó LDH-A) y/o el blanco de la rapamicina en mamíferos (mTOR) que se han documentado, son esenciales para el desarrollo de diversos tipos de cáncer, con el objetivo de crear terapias más eficientes dirigidas a la regulación de estos procesos biológicos (Anshushaug, 2014).

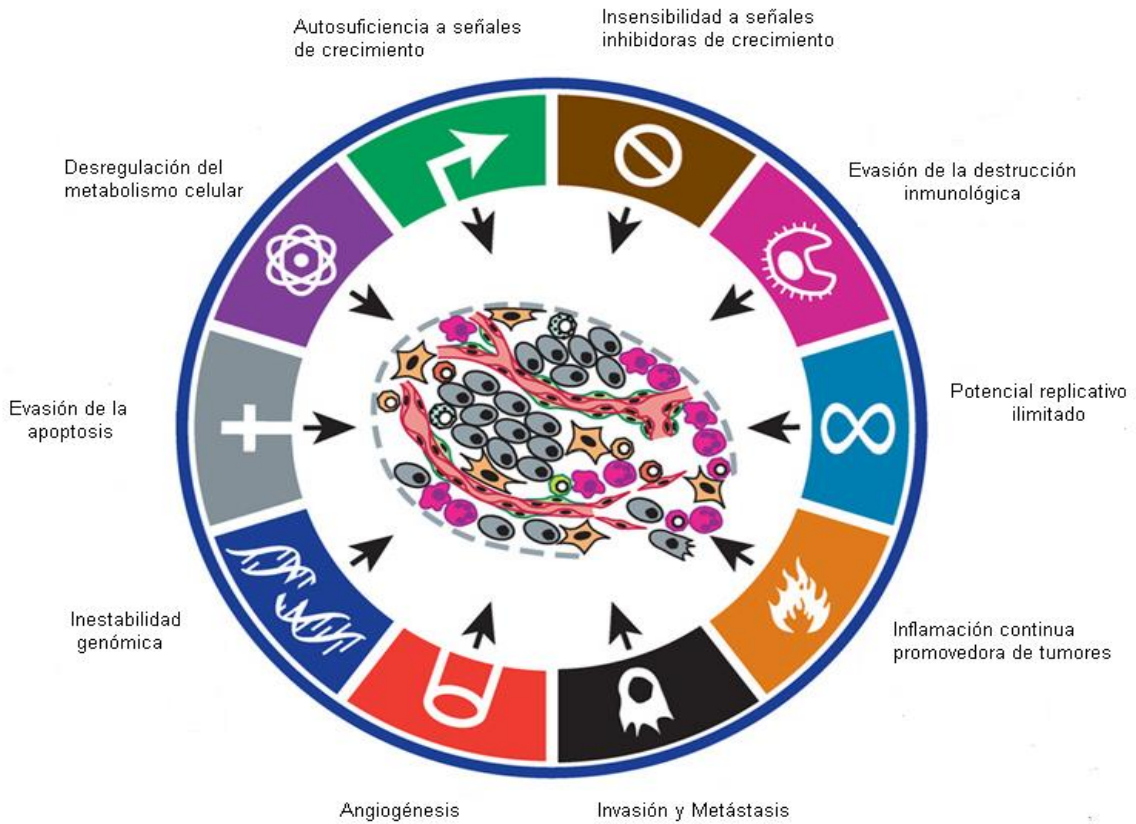


Figura 1: “Hallmarks del cáncer” o características distintivas adquiridas para la progresión de una célula normal a una célula tumoral o cancerígena. (Tomado y modificado de Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2- Cáncer Colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es una neoplasia desarrollada en el colon y recto caracterizada por la formación de pólipos benignos que progresan a un adenocarcinoma maligno (Bonfrate et al., 2013). Ocupa el cuarto lugar entre todos los tipos de cáncer en términos de incidencia y el tercero en términos de mortalidad a nivel mundial para ambos sexos (Ramos et al., 2010). Asimismo, son diagnosticados cada año alrededor de 103.170 nuevos casos y registradas 51.690 muertes (Huo et al., 2014). En México, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer y el cuarto más frecuente en la población, afectando en igual proporción a hombres y mujeres (Ferlay et al., 2012).

La gran mayoría de los diferentes tipos de cáncer, incluido el CCR entre los más importantes surge como resultado de la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos adquiridos que transforman las células epiteliales glandulares normales en adenocarcinomas invasivos. Asimismo, específicamente en el CCR pueden surgir pequeños pólipos en el colon proximal que están asociados con la inestabilidad de microsatélites y la metilación aberrante del ADN en las islas CpG, mientras que surgen adenomas tubulares convencionales a través de la inactivación de *APC* (gen supresor de tumores) y la inestabilidad cromosómica (Pritchard, 2011).

Estudios previos han identificado diferentes alteraciones genéticas que contribuyen a la progresión del CCR, como por ejemplo mutaciones que inactivan los genes supresores de tumores (*p53* y *APC* mutados en el 52% y el 76% de los

tumores, respectivamente) o activan oncogenes (KRAS y BRAF mutados en el 42% y el 10% de tumores, respectivamente) (Mao & Huiping, 2010).

Por otra parte, durante la última década, se ha hecho evidente que la expresión aberrante de pequeñas moléculas denominadas microRNAs tienen un papel funcional en la iniciación y progresión del CCR, sugiriendo que estos miRNAs pueden ser potenciales clasificadores moleculares y biomarcadores de detección temprana así como dianas terapéuticas para esta neoplasia (Schetter, 2012).

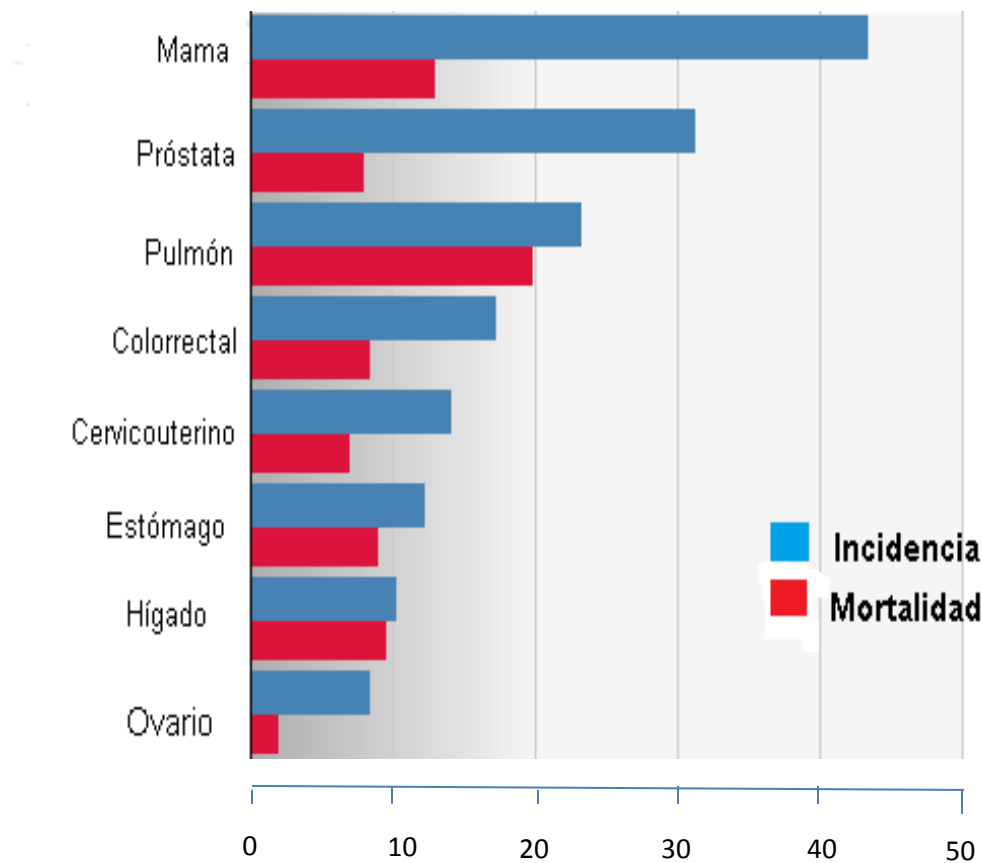


Figura 2: Incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial (Tasa por cada 100,000 personas) (Ferlay et al, 2012).

2.3- MicroRNAs y Cáncer Colorrectal

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNA no codificantes de 22 nucleótidos que funcionan como reguladores negativos de la expresión génica y regulan más del 30% de los genes que codifican para proteínas humanas, mediante la unión a la región 3'UTR de los mRNAs que resulta en la escisión de estos genes y/o detención de la traducción (Filipowicz et al., 2008). Un solo miRNA puede regular cientos de genes simultáneamente y un mRNA puede estar sujeto a regulación por parte de varios miRNAs coordinadamente. Por lo tanto, los miRNAs constituyen una red de regulación compleja en la gestión de cada proceso fisiológico y patológico (Kala et al., 2013).

El desarrollo de CCR se debe a un proceso progresivo, en donde la mucosa normal es transformada en pólipos adenomatosos y eventualmente en carcinoma invasivo. Una de las causas del desarrollo del CCR y que se ha hecho evidente últimamente es que la expresión aberrante de miRNAs tiene un papel funcional en la iniciación y progresión del CCR (Schetter et al., 2012). Hoy en día, se conocen miRNAs específicos que pueden actuar ya sea como oncogenes o supresores de tumor dependiendo del entorno celular en el que se expresan, por ejemplo, se ha visto que aquellos miRNAs situados en regiones genómicas amplificadas en diferentes tipos de cáncer funcionan como oncogenes, mientras que los miRNAs ubicados en porciones de cromosomas eliminados fungen como supresores de tumor (Calin & Croce, 2006).

Estos datos sugieren que los miRNAs podrían representar nuevos instrumentos de diagnóstico y pronóstico en pacientes con alto riesgo de CCR y también

podrían resultar útiles como herramientas terapéuticas. Dicha información indica que las nuevas terapias contra el CCR podrían originarse en la manipulación de miRNAs supresores de tumores y miRNAs oncogénicos o tumorales (Bonfrate et al., 2013).

2.4- Biogénesis de los MicroRNAs

Para la maduración de un MicroRNA es necesario que se lleven a cabo una serie de pasos ordenados: Inicialmente los miRNAs se transcriben como transcritos primarios o pri-miRNA en el núcleo celular; los pri-miRNAs son transcritos de varios cientos de nucleótidos sintetizados a partir de DNA por una RNA polimerasa II (Kala et al., 2013). En el pri-miRNA se encuentra una estructura de tallo-asa de entre 60-70 nt, la cual se procesa en el núcleo por un complejo microprocesador, el cual está formado por Drosha (una RNAsa tipo III) y una proteína con dominios de unión a RNA de doble hebra llamada Pasha, generando así un pre-miRNA, el cual será transportado del núcleo hacia el citoplasma con la ayuda de la exportina 5 (Filipowicz et al., 2008). Ya en el citoplasma, la RNAsa tipo III denominada Dicer remueve el asa terminal del pre-miRNA, reduciéndose a una cadena doble de ~22 pares de bases (pb). Posteriormente el RNA pequeño de doble cadena es reclutado al complejo RISC ("RNA Induced Silencing Complex") que junto con las proteínas Argonautas inducen el silenciamiento de los mRNA. Las Argonautas pueden ejercer 2 funciones: degradar una de las dos hebras del RNA pequeño para dar como resultado final al miRNA funcional e inhibir la traducción del mRNA cuando el miRNA no es totalmente complementario o simplemente degradar el mRNA si este es totalmente complementario con el miRNA (Esquela et al., 2006).

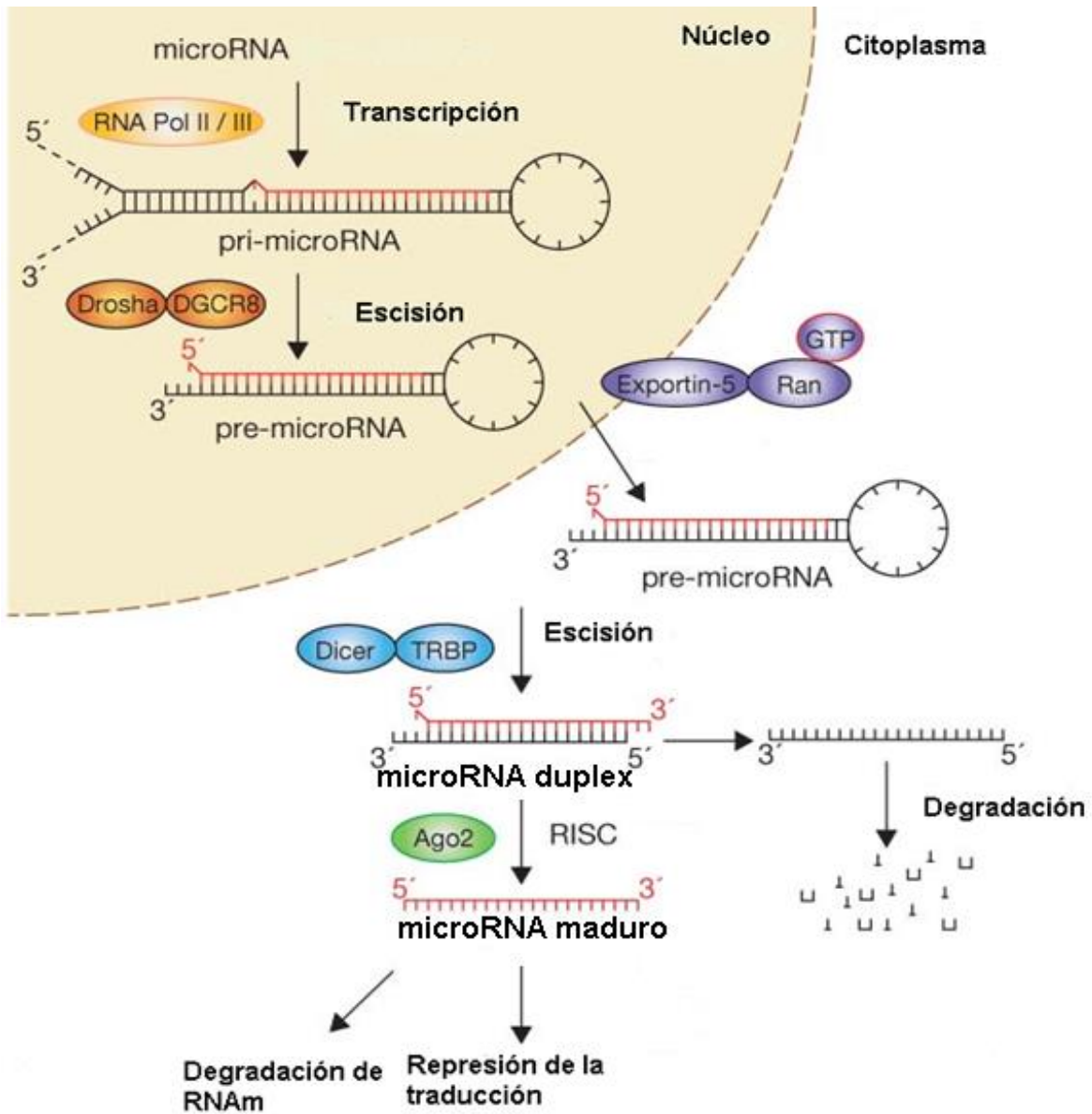


Figura 3: Biogénesis de MicroRNAs. Procesamiento de miRNAs en el núcleo y su maduración en el citoplasma donde se incorporan al complejo RISC, para llevar a cabo ya sea la represión de la traducción o la degradación del mensajero blanco (Tomado y modificado de Winter, 2009).

2.5- Autofagia

La autofagia es un proceso homeostático fundamental en la célula, que le permite degradar sus componentes dañados. Este proceso se lleva a cabo en una serie de pasos ordenados caracterizados principalmente por la formación de autofagosomas. Esta función se conserva en todos los organismos eucarióticos, desde levaduras hasta humanos (Roy, 2010).

En este proceso el material citoplasmático es secuestrado en una vesícula de doble membrana denominada autofagosoma que posteriormente se fusiona con varios lisosomas para formar estructuras denominadas autolisosomas. En esta etapa, enzimas llamadas hidrolasas degradan el componente citoplasmático para su posterior reciclaje (Takabatake et al., 2014).

Se sabe que la desregulación de la autofagia puede causar diferentes patologías de numerosas enfermedades humanas como el cáncer. Sin embargo la autofagia evita la carcinogénesis a través de la constante eliminación de moléculas y organelos dañados produciendo muerte celular (Wang et al., 2013).

2.5.1- Autofagia y MicroRNAs

En cáncer es frecuente encontrar mutaciones en genes promotores de autofagia como ULK1, Atg4, beclina-1 y LC3/Atg8, y recientemente se ha demostrado que los miRNAs pueden estar involucrados en la modulación de estas vías de señalización en procesos patológicos (Titone et al., 2014). Hasta el momento, se han identificado miRNAs que pueden regular negativamente el proceso de

autofagia a través de la regulación de sus posibles blancos en diferentes etapas (Figura 4) (Fu et al., 2012), las cuales se describen a continuación. a) Inducción: el miRNA 106a inhibe el complejo ULK-1, inductor del proceso de autofagia, su participación es en una etapa temprana. En esta primera etapa de la autofagia comienza la formación de vesículas denominadas fagóforos que son estructuras primarias que se forman antes y dan lugar a la formación de los autofagosomas. b) Nucleación de vesículas: etapa que depende de la actividad de beclina-1; en este paso, los genes miRNA 30a y miRNA 376b pueden inhibir la actividad de beclina-1 bloqueando así la nucleación de vesículas y el inicio de la formación de los autofagosomas. c) Alargamiento de vesículas, mediado por sistemas de conjugación ubiquitina como LC3/Atg8, durante este proceso los miRNAs 183, 204 y 101 pueden bloquear la activación de LC3 y Atg4 impidiendo así la formación de autofagosomas. d) Acoplamiento y fusión del autofagosoma con el autolisosoma maduro que es promovido por Rab7, Skd1 y otras proteínas. En ésta última etapa se da la degradación y reciclaje de nutrientes, lo que resulta en generación de energía. (Fu et al., 2012).

En las células cancerosas, la autofagia es un mecanismo fisiológico importante que puede servir como un medio de supervivencia temporal, mientras que, si los resultados de estrés celular continúan, se llevaría a cabo un proceso de muerte celular. La relación que existe entre la autofagia y la tumorigénesis se ha explorado recientemente, sin embargo, el rol de la autofagia como tumorigénico o antitumoral en la carcinogénesis o en la terapia contra el cáncer aún no está bien definido (Shengtao et al., 2012).

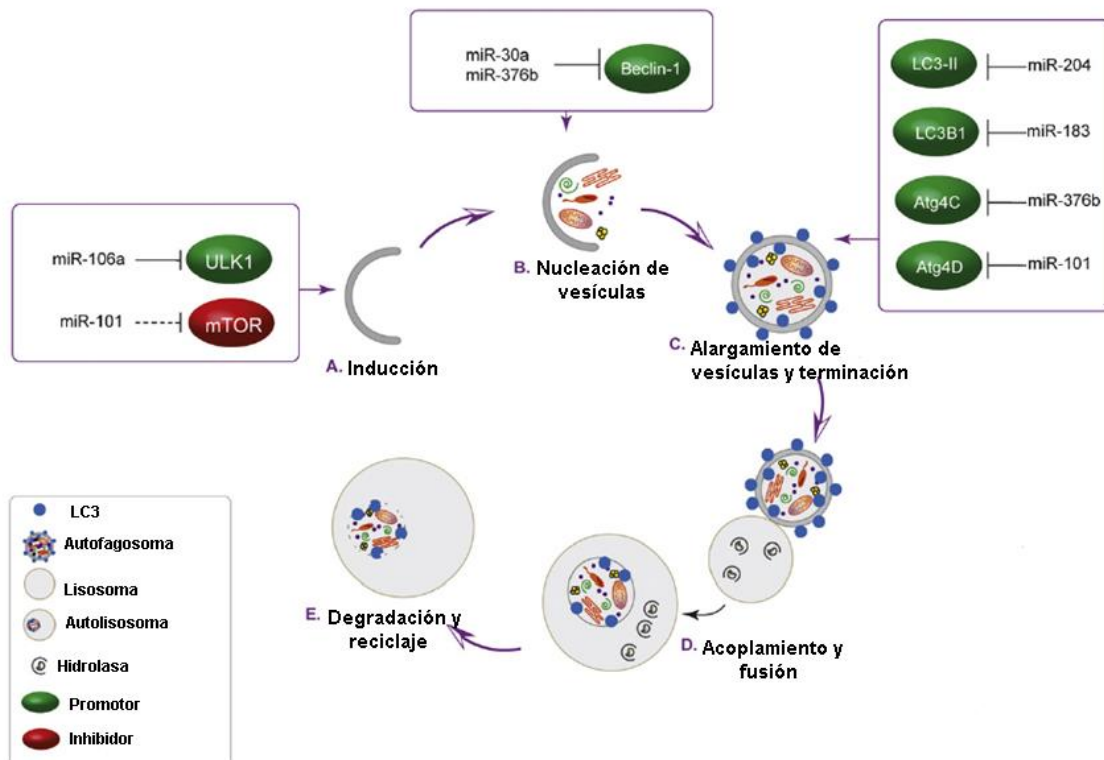


Figura 4: Regulación del proceso de autofagia por miRNAs. Los miRNAs participan como reguladores negativos y pueden impedir las diferentes etapas del proceso de autofagia (Tomado y modificado de Fu et al., 2012).

2.6- Metabolismo del cáncer y Autofagia

Las células tumorales tienen una alteración en su metabolismo y utilizan preferentemente glucosa a través de la glicólisis aeróbica (efecto Warburg) (Chen et al., 2007). Estas células tienen mayor necesidad de energía y fuente de carbono y nitrógeno para la producción de biomasa debido a la hiper-proliferación, dicha energía se consigue principalmente a través del metabolismo (Mathew & White, 2011).

La regulación del metabolismo está controlada por diferentes genes, tales como succinato deshidrogenasa (SD), fumarato hidratasa (FH) y la isocitrato deshidrogenasa (IDH), mutaciones en dichos genes se observan en ciertos tipos de cánceres humanos y están vinculados a la activación de factores inducibles por hipoxia (*HIF*) (Wang et al., 2014). La activación de oncogenes como HIF1- α y c-Myc promueven la glucólisis y la descomposición anaeróbica de piruvato a lactato lo que conlleva a una sobreexpresión de la enzima LDH-A. Del mismo modo, la activación de HIF induce la transcripción de la proteína 19K-que interactúa con Bcl-2/adenovirus para inducir la autofagia mitocondrial selectiva, lo que podría elevar la dependencia al proceso de autofagia. De hecho, se requiere este proceso para acceder al almacenamiento de grasa intracelular de los ácidos grasos libres para apoyar los defectos del metabolismo (Díaz-Ruiz et al., 2010).

Dado el papel de la autofagia en la generación de estos sustratos a través del reciclaje macromolecular, problemas en el flujo autofágico pueden tener un profundo impacto en la disponibilidad de sustrato mitocondrial. El papel del metabolismo como apoyo de la autofagia puede tener consecuencias dramáticas a tumores establecidos con aumento de la demanda metabólica. En este contexto, será interesante examinar el papel de la autofagia en los tumores con la activación constitutiva de oncogenes como *myc* y *ras* donde el metabolismo elevado puede requerir a la autofagia para inducir estrés y desencadenar muerte celular mediante este proceso e inhibir la demanda metabólica elevada del crecimiento del tumor (Mathew & White, 2011).

2.7- Tratamientos farmacológicos para Cáncer Colorrectal

El desarrollo del CCR es un proceso que implica múltiples vías moleculares, como la formación de adenomas (denominada "secuencia adenoma-carcinoma"), que es un proceso que puede durar varias décadas. Por lo tanto, los adenomas se consideran un paso muy importante para el desarrollo de CCR en los ensayos clínicos (Pritchard et al., 2011).

Debido a este hecho, las estrategias terapéuticas que han ganado interés en los últimos años proponen fármacos como son los salicilatos, antiinflamatorios no esteroideos (AINE), inhibidores de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y fármacos inductores de muerte celular por apoptosis o autofagia, como la Doxorrubicina y la Metformina, que recientemente se han propuesto como inhibidores de vías relacionadas con proliferación celular y alta tasa glucolítica, y cuyo mecanismo de acción pueda estar directamente relacionado con la prevención del CCR (Manzano y Segura-Pérez, 2012). En este proyecto de tesis, trabajamos con tres fármacos: Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de Sodio probables, inductores del proceso de autofagia que, como se sabe, están directamente relacionados con la inhibición de diferentes vías como glucólisis y mTOR.

2.7.1- Doxorrubicina

La Doxorrubicina es una antraciclina (Figura 5) con actividad antineoplásica que se utiliza para el tratamiento de varios tipos de cáncer humano como mama y CCR. Su eficacia está ligada con su capacidad para interferir con varios componentes celulares, incluyendo la intercalación de DNA y la inhibición de la

topoisomerasa II, la inhibición de DNA y RNA polimerasas y la generación de radicales libres que dañan el DNA y las proteínas celulares (Alkin et al., 2015).

La eficacia del tratamiento con Doxorubicina está limitada por su toxicidad y algunos mecanismos de resistencia como la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), además de la sobre-expresión de transportadores de membrana como la glicoproteína-P/MDR1 (Pgp) (González, 2011). Debido a todos estos factores, se han propuesto mecanismos alternativos para describir los efectos antitumorales de la Doxorubicina y con ello ofrecer explicaciones concretas de por qué algunos tipos de cáncer son sensibles al tratamiento con Doxorubicina, mientras que otros pierden eficacia (Hill et al., 2014).

Uno de los mecanismos más importantes y mejor explorados para describir los efectos antitumorales es la conversión reductora de la Doxorubicina, que ha sido implicado como un determinante principal de la citotoxicidad de este fármaco. Dicha conversión reductora se caracteriza por la pérdida de un electrón de la fracción de quinona de la Doxorubicina, esto a través de NADPH y la reductasa de citocromo P450, resultando el radical semiquinona. Una vez que el radical semiquinona se ha formado, puede producir efectos tóxicos directos u oxidarse de nuevo a la forma quinona, es decir, se lleva a cabo un ciclo rédox (Finn, et al., 2011).

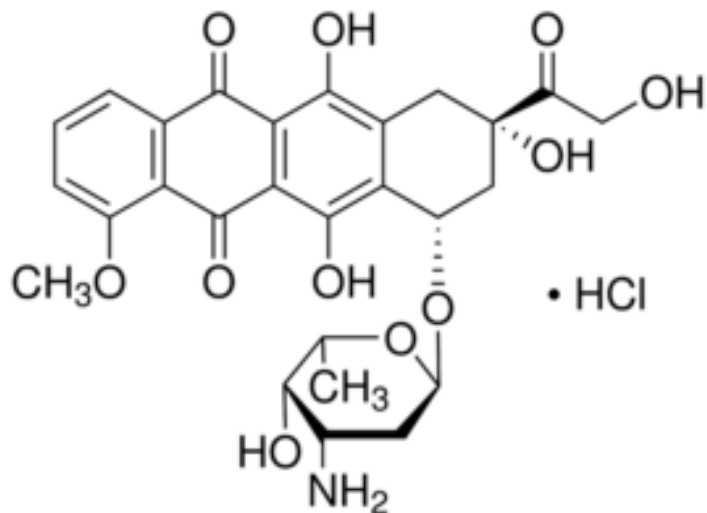


Figura 5: Estructura química de la Doxorubicina: C₂₇H₂₉NO₁₁ (Sigma Aldrich).
www.sigmaaldrich.com/united-states.html.

2.7.2- Metformina

La Metformina es una biguanida que se utiliza para el tratamiento de la Diabetes Mellitus Tipo II (DMT II), con la ventaja clínica de no inducir hipoglucemia. Se ha comprobado que tiene efectos quimiopreventivos y antineoplásicos en muchos tipos de tumores malignos como es en el caso del cáncer de mama. Sin embargo, los mecanismos responsables de las acciones de la metformina son diversos y pueden diferir de acuerdo al tipo de cáncer, es por ello que la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares específicos de cada neoplasia es importante para optimizar la estrategia de tratamiento con éste fármaco (Feng et al, 2014).

La principal función de la Metformina es disminuir la producción de glucosa hepática a través de un mecanismo que requiere de la quinasa B1, que es

activada por la proteína AMP-quinasa y genes neoglucogénicos que controlan el ciclo metabólico. Los efectos de la Metformina en esta vía provocan una disminución en la síntesis de proteínas y en la proliferación celular, es decir, la Metformina entra en la célula a través del transportador de OCT1 e inhibe el complejo 1 de las mitocondrias, que conduce a una activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK)/vía LKB1, e induce la detención del crecimiento celular, la apoptosis y la autofagia de las células cancerosas (Figura 6) (Shi et al., 2012). Asimismo, los efectos anticancerígenos de la Metformina pueden estar mediados a través de la activación de la vía LKB1-AMPK antes mencionada, que resulta en la inhibición de la proteína mTOR, quien comúnmente activa las células malignas y está asociada con la resistencia a los fármacos contra el cáncer. Esto se presenta debido a que las células cancerosas típicamente muestran una alta tasa de los procesos anabólicos que consumen energía y conducen a la síntesis de lípidos, proteínas y DNA. Todos estos cambios metabólicos requieren energía y por lo tanto son controlados por la vía de LKB1-AMPK, el regulador clave del estado de energía celular (Cerezo et al, 2014).

Dichas observaciones han dado el impulso para investigaciones sobre el papel de la Metformina en la regulación de la proliferación tumoral, la regulación del ciclo celular, la apoptosis y la autofagia, así como también se ha demostrado que podría ser utilizada como un fármaco anticanceroso eficaz en diversas neoplasias tales como próstata, mama, pulmón y colon (Lehraiki et al, 2014).

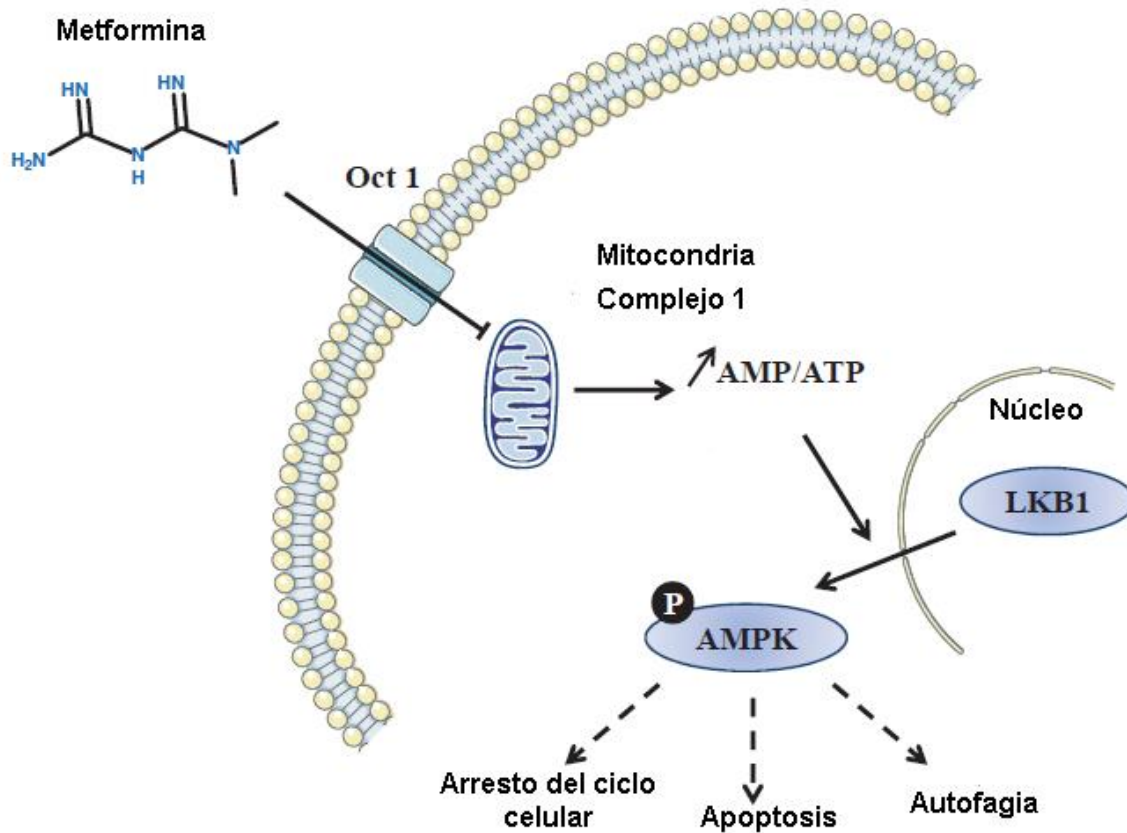


Figura 6: Efectos de la Metformina en las células cancerosas. La Metformina entra en la célula a través del transportador OCT1 e inhibe el complejo 1 de las mitocondrias que conduce a una activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) / vía LKB1 e induce la inhibición del crecimiento celular, la apoptosis y la autofagia de las células cancerosas (Tomado y modificado de Cerezo et al, 2014).

2.7.3- Oxamato de Sodio

El Oxamato de sodio es un fármaco inhibidor de la lactato deshidrogenasa (LDH-A) que evita la conversión de piruvato a lactato en el citosol (Figura 7) y por lo tanto evita la acidosis láctica, la cual es un fenómeno común en el microambiente del cáncer y se relaciona con la proliferación celular, metástasis y la inhibición de la respuesta inmune contra las células cancerosas (Miskimins et al., 2014).

Una tasa elevada de consumo de glucosa y la dependencia de la glucólisis aerobia para la generación de ATP, son dos factores asociados a las células cancerosas, fenómeno conocido como efecto Warburg. Durante este fenómeno, la conversión de glucosa a lactato, en lugar de la metabolización a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, es mucho menos eficiente ya que se genera menos ATP por unidad de glucosa metabolizada (Suchorolski et al., 2013). Por lo tanto, se requiere una alta tasa de absorción de glucosa para satisfacer el aumento de energía necesario para apoyar la progresión tumoral rápida. Por otra parte, una de las enzimas que cataliza la transformación del piruvato a lactato acompañada por la conversión de NADH a NAD⁺ y que desempeña un papel vital en el proceso de la glucólisis es la LDH-A, la cual juega un papel esencial en el mantenimiento de tumor, el crecimiento y la progresión (Yang et al., 2014). Se ha visto en estudios anteriores que el Oxamato, un inhibidor que compite por sitio activo de la enzima LDH-A, inhibe el crecimiento de células de cáncer de mama, hígado y de cuello uterino *in vitro*, además mejora significativamente la sensibilidad de las células cancerosas a varios agentes quimioterapéuticos (Xiaoming et al, 2013).

Actualmente, se ha visto que la glucólisis aeróbica apoya diversas vías biosintéticas y en consecuencia los mecanismos metabólicos para la proliferación. La vía de PI3K se considera un determinante importante del fenotipo glucolítico a través de AKT1 y la señalización de mTOR (Makinoshima et al., 2015).

En estudios anteriores, células CNE-1 y CNE-2 de carcinoma neuroendocrino del colon tratadas con Oxamato, se observó una inhibición de la proliferación celular de una manera dosis-dependiente del tiempo, además promover la apoptosis a través de la mejora de la generación de ROS mitocondrial. Por lo tanto, el metabolismo energético alterado en células cancerosas ofrece una atractiva oportunidad para el desarrollo de estrategias terapéuticas contra el cáncer (Zhai X et al, 2013).

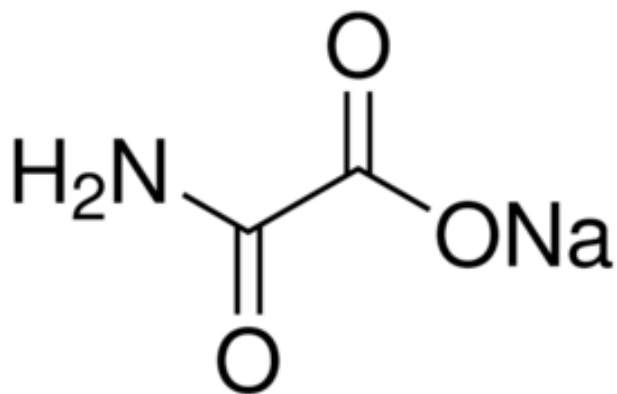


Figura 7: Estructura química del Oxamato de sodio: C₂H₂NNaO₃ (Sigma Aldrich).

www.sigmaaldrich.com/united-states.html.

3.- Justificación

El CCR es un problema de salud pública en México y a nivel mundial y constituye una causa importante de morbilidad y mortalidad en nuestro país. A pesar de la existencia de terapias para esta enfermedad, aún no se tiene un tratamiento eficaz y específico.

Por lo tanto, el conocimiento de la expresión diferencial de moléculas con importantes funciones reguladoras, como los microRNAs, puede ayudar a identificar factores pronósticos de respuesta al tratamiento y nuevos blancos terapéuticos, así como en la búsqueda de marcadores predictivos de toxicidad y respuesta a fármacos que permitan realizar una terapia personalizada y alternativa a la quimioterapia actual. Recientemente se ha documentado que la monoterapia en cáncer puede desarrollar quimioresistencia en la mayoría de los pacientes. Actualmente se están desarrollando terapias empleando combinaciones de fármacos inhibidores que participan en diferentes vías de señalización que están mutadas en el cáncer e involucradas en procesos biológicos como apoptosis y autofagia.

Este proyecto consistió en la inducción del proceso de autofagia en una línea celular de CCR (HCT116) mediante la exposición de tres fármacos: Metformina y Oxamato de Sodio, inhibidores de mTOR y glucólisis respectivamente, en coadyuvancia con Doxorrubicina, quimioterapéutico convencional para la identificación de los microRNAs asociados a la autofagia, con el objetivo de plantear una posible alternativa para el tratamiento de esta neoplasia.

4.- Hipótesis

La combinación de Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio inducirá autofagia en la línea celular HCT116 de CCR humano, lo cual producirá un cambio en el nivel de expresión de miR-183, miR-106a y miR-101; involucrados en este proceso.

5.- Objetivos

General

Evaluar la expresión de los miRNAs: miR-106a, miR-101 y miR-183 involucrados en el proceso de autofagia en la línea celular HCT116 de cáncer colorrectal.

Particulares

1. Determinar las CI_{50} *in vitro* de los fármacos individuales y en combinación mediante sulforrodamina B (SFR-B).
2. Determinar la expresión relativa de miR-106a, miR-101 y miR-183, involucrados en el proceso de autofagia en condiciones basales y con tratamientos.
3. Analizar el tipo de muerte celular mediante la detección de marcadores protéicos.

6.- Material y Métodos

6.1- Cultivo celular

La línea celular HCT116 de CCR humano fue obtenida del Instituto Nacional de Cancerología (InCan). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (Gibco®, Life Technologies) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Biowest) y antibiótico/antimicótico; se mantuvieron en condiciones de esterilidad en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 70-80% fueron utilizadas para los ensayos correspondientes.

6.2- Determinación de la CI₅₀ de la línea celular HCT116

Por medio del ensayo colorimétrico Sulforodamina B (SFR-B), se determinó la densidad celular basado en la medición del contenido de proteína celular para obtener la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de los fármacos a diferentes concentraciones, siguiendo el protocolo descrito por Vichai y Kirtikara (2006). Las células HCT116 fueron sembradas en placas de 96 pozos (7000 células por pozo). Se sembró una placa cero que fue empleada como control; después de 24 horas, la placa cero se fijó con ácido tricloroacético frío (TCA) al 10% para posteriormente teñir las células con SFR-B (MP BIOMEDICALS). El número de células viables es directamente proporcional a la formación de colorante unido a la proteína que después se solubilizó con 10 mM de solución Tris base (Promega, USA) con pH 10.5. La densidad óptica (DO) se midió en un lector de microplacas (EPOCH, Biotek) a 510 nm. Por otra parte, las células en las placas experimentales fueron

estimuladas con los fármacos a diferentes concentraciones: Doxorrubicina (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, y 1.5 μ M) (Doxolem®RU, 10mg/5ml), Metformina (0.001, 0.1, 5, 20, 35, 50, 65mM) (Santa Cruz Biotechnology) y Oxamato de sodio (0.01, 0.5, 5, 15, 25, 35, 45mM) (Santa Cruz Biotechnology). Posteriormente se realizaron los tratamientos con sus posibles combinaciones. Las concentraciones que se emplearon fueron las establecidas para los fármacos individuales (Tabla 1). Los fármacos de cada tratamiento se disolvieron en RPMI-1640 suplementado con SFB al 2%. Después de 24 horas de exposición a los fármacos, la supervivencia celular se midió por el método ya descrito anteriormente. La IC₅₀ se determinó a partir de una regresión lineal ($R^2 = 0.92$) para obtener las gráficas dosis-respuesta gradual. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente.

Tabla 1: Concentraciones de las combinaciones de los fármacos utilizados para el ensayo de Sulforodamina B (SFR-B) en la línea celular HCT116 de CCR.

Fármacos	Tratamientos (Combinaciones)
Metformina/Doxorrubicina	2mM/0.2µM, 12mM/0.4µM, 22mM/0.6µM, 32mM/0.8µM, 42mM/1µM
Oxamato/Doxorrubicina	5mM/0.2µM, 10mM/0.4µM, 15mM/0.6µM, 20mM/0.8µM, 25mM/1µM
Metformina/Oxamato	0.01mM/.1mM, 2mM/5mM, 12mM/10mM, 22mM/15mM, 32mM/20mM
Doxorrubicina/ Metformina/ Oxamato	0.01µM/0.01mM/0.1mM, 0.2µM/2mM/5mM, 0.4µM/12mM/10mM, 0.6µM/22mM/15mM, 0.8µM/32mM/20mM

6.3- Análisis de la expresión de MicroRNAs

6.3.1- Extracción de RNA

Se aisló el RNA total de las células HCT116 expuestas a todos los tratamientos a 2, 4, 6 y 8 horas por el método TRIzol[®] Reagent (Life Technologies) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, se retiró el medio y se agregó 1ml de TRIzol (Invitrogen), posteriormente se añadió cloroformo y se centrifugó durante 15 min. a 13000 rpm. Se obtuvo la fase acuosa (RNA) y se dejó precipitando con isopropanol, el cual se retiró después de centrifugar durante 25 min. a 13000 rpm. Finalmente se realizaron lavados con etanol (EtOH) al 75%. El RNA se resuspendió en 30µl de agua libre de RNAsas y fue almacenado a -80 °C.

La cantidad total de RNA se cuantificó en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm y la integridad del mismo se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5 % teñido con EtBr (Bromuro de Etidio).

6.3.2- Retrotranscriptasa

Se utilizaron 100ng de RNA total para generar cDNA utilizando el kit Taqman[®] MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems), siguiendo el protocolo del fabricante. Las condiciones para generar el cDNA se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Condiciones de pre-amplificación para generar cDNA de la línea celular HCT116 de CCR expuesta a 4 tiempos de exposición a los fármacos.

Paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	30	16
2	30	42
3	5	85
4	∞	4

6.3.3- qRT-PCR

Con el objetivo de conocer el nivel de expresión de los diferentes genes a evaluar, se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR). Las amplificaciones se realizaron por duplicado en el LightCycler 2.0 de Roche, utilizando el kit LightCycler® Taqman® Master y las sondas Taqman para (MicroRNAs) miR-106a, miR-183 y miR-101 (Taqman® MicroRNA Assays), como un control de normalización, se utilizó RNU44. Las condiciones de amplificación se muestran en la tabla 3. Se calculó el valor relativo de expresión de los genes durante las etapas establecidas basadas en diferentes tiempos y tratamientos utilizando el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Applied Biosystems).

Tabla 3: Condiciones de amplificación para los diferentes miRNAs involucrados en el proceso de autofagia.

Periodos	Temperatura	Duración	Ciclos
Desnaturalización	95°C	10 min.	1
	95°C	10 seg.	
Amplificación	60°C	40 seg.	40
	72°C	1 seg.	
Enfriamiento	40°C	30 seg.	1

6.4- Extracción de Proteínas

Con el fin de detectar proteínas involucradas en la autofagia se realizaron diversas extracciones. Para la obtención de proteínas se utilizaron cultivos celulares a ~80% de confluencia. La extracción de proteínas totales se llevó a cabo utilizando buffer de lisis RIPA (Santa Cruz Biotechnology) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasa COMPLETE 10X de ROCHE. Se retiró el medio de cultivo de las placas petri (100X15mm) que contenía las células HCT116, la placa fue lavada con PBS no estéril al 1x y posteriormente se agregó el buffer de lisis RIPA. A continuación se raspó la caja petri con ayuda de un scraper y la suspensión celular fue colectada en tubos eppendorf de 1.5 ml. La suspensión celular fue sometida a agitación en un vortex para deshacer los agregados celulares y finalmente centrifugada para separar los residuos celulares insolubles. La cantidad

de proteínas obtenidas fue cuantificada con base en la técnica colorimétrica de Bradford (BIO-RAD). La lectura se realizó en un espectrofotómetro de placas Epoch marca biotek. Los ensayos se realizaron de forma independiente y por triplicado.

6.5- Western Blot

Con el objetivo de detectar la expresión de las proteínas ULK1, ATG4b y LC3 I yII; se utilizó la técnica de inmunodetección en membrana. Las muestras de proteínas (50 µg) fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts por 2 horas aproximadamente. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF (*polifluoruro de vinilideno*) con un poro de 0.45 µm mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20 volts por 30 minutos. Al terminar la transferencia, la membrana de PDVF fue bloqueada con una solución de leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.1 % por 2 horas. Posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-Tween y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario correspondiente a la proteína a detectar (Tabla 4). Una vez transcurrido el tiempo de incubación del anticuerpo (Ab) primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween y se incubó con el Ab secundario correspondiente por 2 horas a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con TBS-Tween se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (Thermo Scientific) para la detección de los inmunocomplejos. La membrana fue

analizada en un digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR); las imágenes resultantes se analizaron en el software ImageStudio (Li-COR)

Tabla 4. Listado de anticuerpos utilizados para Western Blot para la detección de autofagia en la línea celular HCT116.

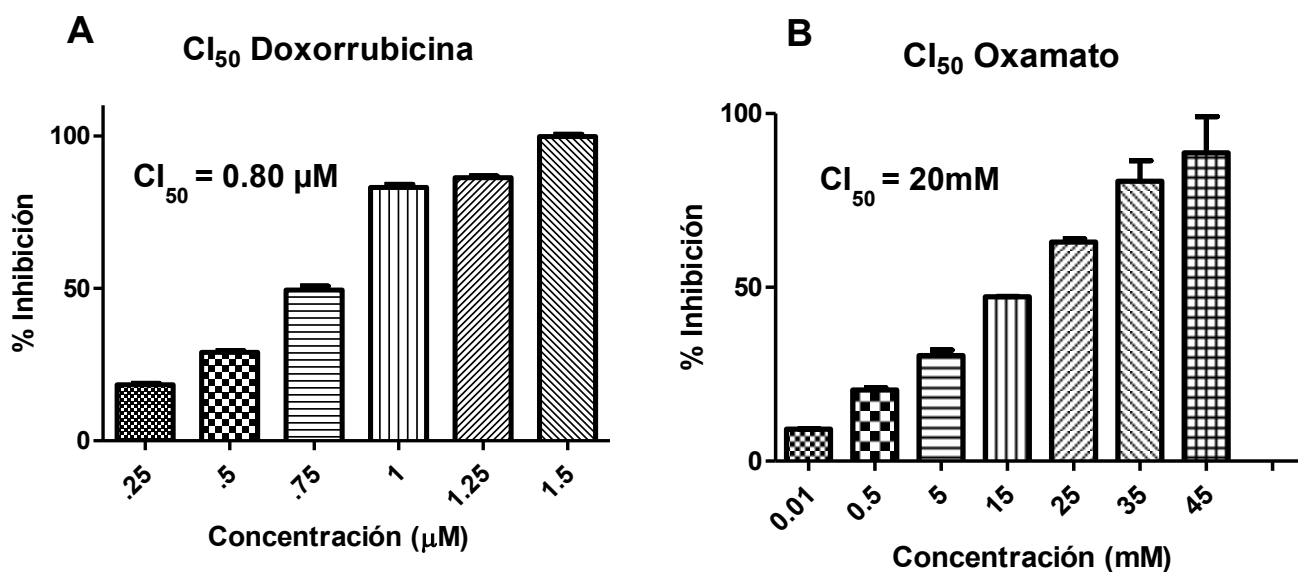
Anticuerpo	No. catálogo	Ab secundario
ULK1	8054s	Anti-rabbit
ATG4b	sc-130968	Anti-rabbit
LC3	2775s	Anti-rabbit
Beta Actina	sc-47778	Anti-mouse
Anti-mouse IgG-HRP	7076s	
Anti-rabbit IgG-HRP	7074s	

7.- Resultados

Evaluación citotóxica de los fármacos

Se observó que el porcentaje de inhibición del crecimiento celular de los fármacos individuales (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio) incrementa conforme a la concentración del fármaco, es decir, es dependiente de dosis y tiempo.

Al analizar los datos obtenidos con los fármacos individuales, podemos observar que la Doxorrubicina actuó a concentraciones muy bajas en comparación con la Metformina y el Oxamato de sodio. La CI_{50} para este fármaco es de $0.83\mu\text{M}$ a 24 horas de exposición al estímulo. Las CI_{50} de los fármacos Metformina y Oxamato se obtuvieron a concentraciones mucho más altas con respecto a la Doxorrubicina, con valores de 31.6mM para Metformina y 20.4mM para Oxamato de sodio (Figura 8). Los valores obtenidos para cada fármaco individual y en combinación fueron a 24 horas de exposición al estímulo.



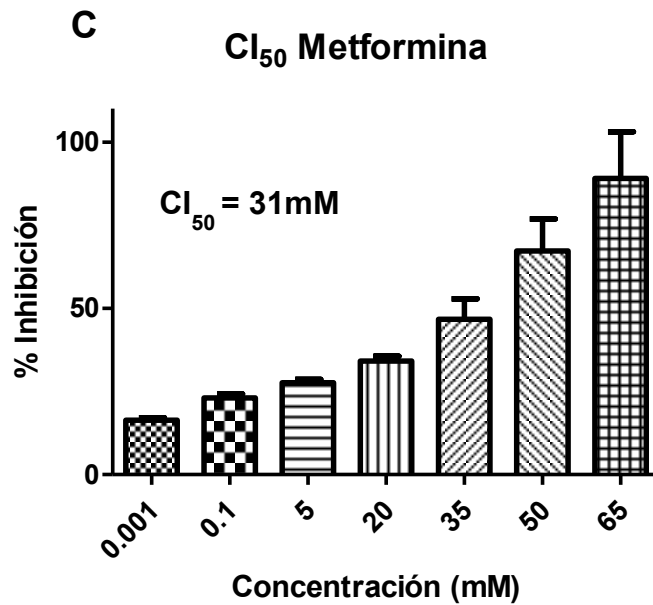


Figura 8: Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀) de los fármacos individuales A) Doxorrubicina; B) Oxamato; C) Metformina en la línea celular HCT116 a 24h de exposición con el estímulo.

En lo que respecta a las combinaciones farmacológicas, los resultados obtenidos mostraron que la combinación de los tres fármacos induce la inhibición de la proliferación celular en sinergia cerca del 100% con las CI₅₀ determinadas individualmente, es decir, el efecto de los tres fármacos en conjunto se ve potencializado, por lo que se procedió a exponer a la línea celular a concentraciones menores. La CI₅₀ para la combinación de los tres fármacos se estableció a concentraciones de 12mM, 10mM y 0.4μM para Metformina, Oxamato y Doxorrubicina, respectivamente. Las combinaciones de Metformina/Oxamato y Metformina/Doxorrubicina mostraron un porcentaje de inhibición entre 30 y 80% a 24 horas, lo que sugiere que producen un efecto citotóxico alto en conjunto de

igual manera que con la mezcla de Oxamato/Doxorrubicina que inhibe más del 50% de las células (Figura 9).

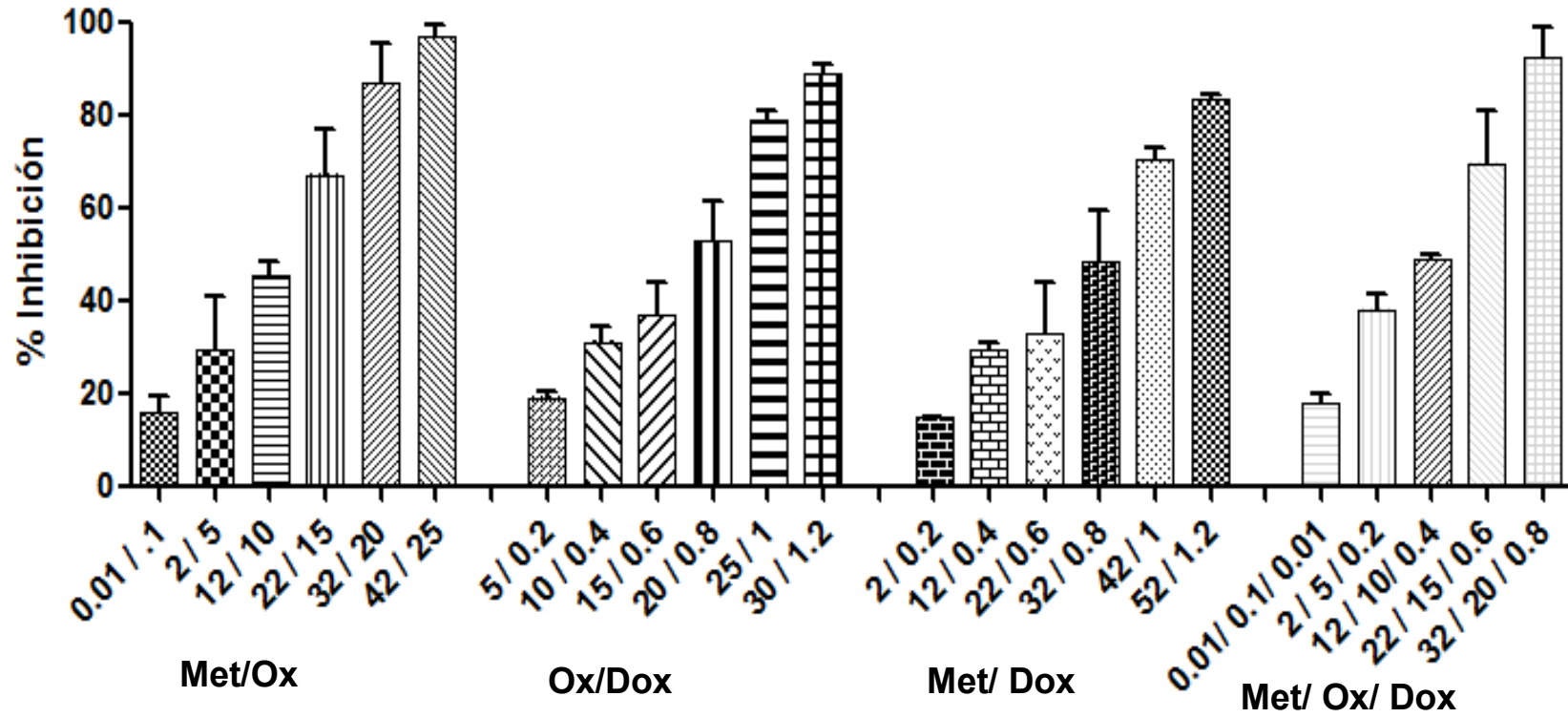


Figura 9.- Concentración Inhibitoria 50 (CI_{50}) de los fármacos en combinación a 24 h de exposición al fármaco en la línea celular HCT116 de CCR. Met (mM), Ox (mM), Dox (μ M).

Expresión Relativa de MicroRNAs involucrados en el proceso de autofagia

Se evaluó la expresión relativa de microRNAs involucrados en el proceso de autofagia, tales como miR 106a (Figura 10), miR 101 (Figura 11) y miR 183 (Figura 12). En las gráficas se observa que con Doxorubicina y Metformina/Oxamato el nivel de expresión de los miRNAs se reduce en comparación con el control negativo (sin tratamiento) a excepción del nivel de miR-183 donde no hay diferencias significativas. Sin embargo podemos observar que la expresión de miR 106a, miR 183 y miR 101 con la combinación de los tres fármacos muestra una disminución significativa en comparación con el control negativo; esta disminución es más evidente en base al tiempo de exposición a los fármacos. Después del tratamiento de seis horas con la combinación de los tres fármacos, la expresión de miR-101 se reduce de manera significativa en comparación con 2 y 4 horas.

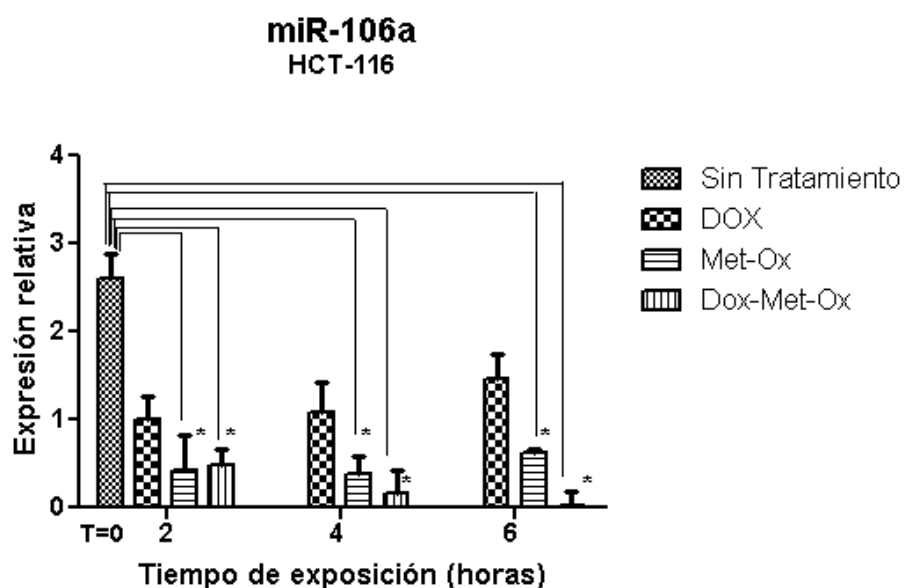


Figura 10.- Expresión relativa de miR 106a a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).

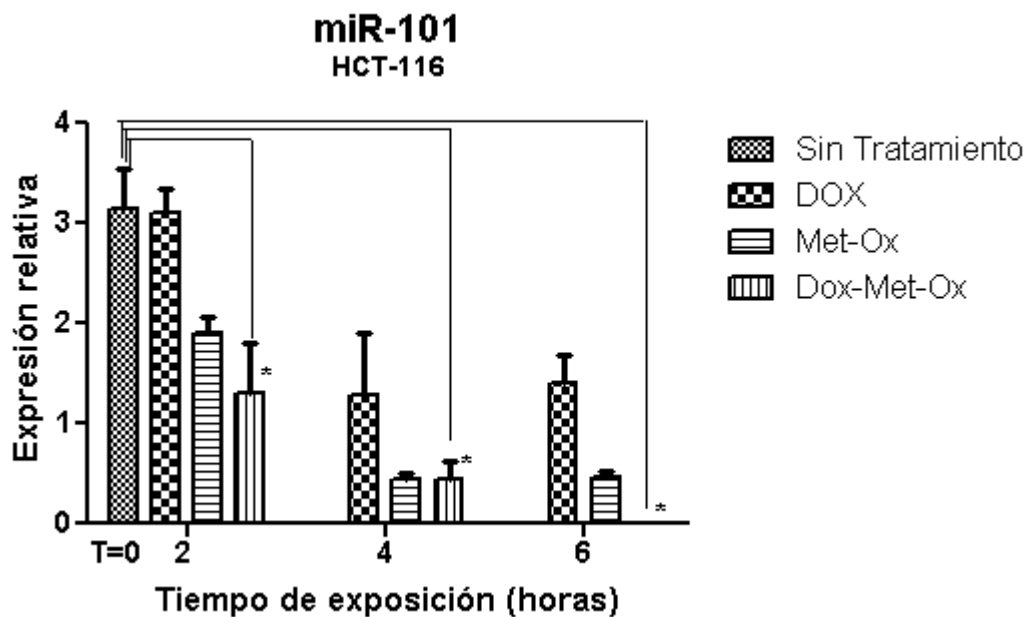


Figura 11.- Expresión relativa de miR 101 a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorrubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).

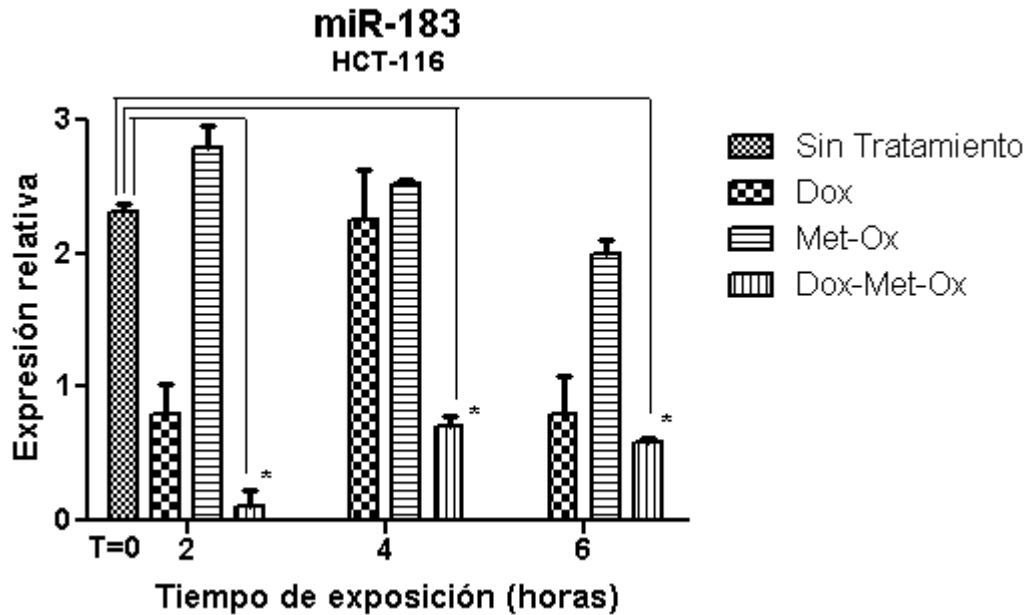


Figura 12.- Expresión relativa de miR 183 a 2, 4 y 6 horas de exposición con Doxorubicina, Met-Ox y Dox-Met-Ox en la línea celular HCT116. (*p=0.05).

Detección de proteínas involucradas en la autofagia

En la autofagia existen proteínas esenciales que participan en la inducción y en las diferentes etapas del desarrollo de este proceso, tales como: ULK1, ATG4b y LC3, las cuales también se han reportado como posibles blancos de miR-106a, miR-101 y miR-183 respectivamente. Por lo tanto, se consideró importante conocer su expresión a nivel de proteína.

En la figura 13 se observa que a los diferentes tiempos de exposición con los tratamientos de Doxorubicina y Metformina/Oxamato, la detección de la proteína ULK1 no se ve alterada en comparación del control negativo, sin embargo, en presencia de la combinación de los tres tratamientos vemos un aumento significativo que posteriormente a partir de las 6 horas se mantiene en la detección

de esta proteína en comparación con el control negativo (sin tratamiento). Este aumento es más notable conforme aumenta el tiempo de exposición a estos fármacos.

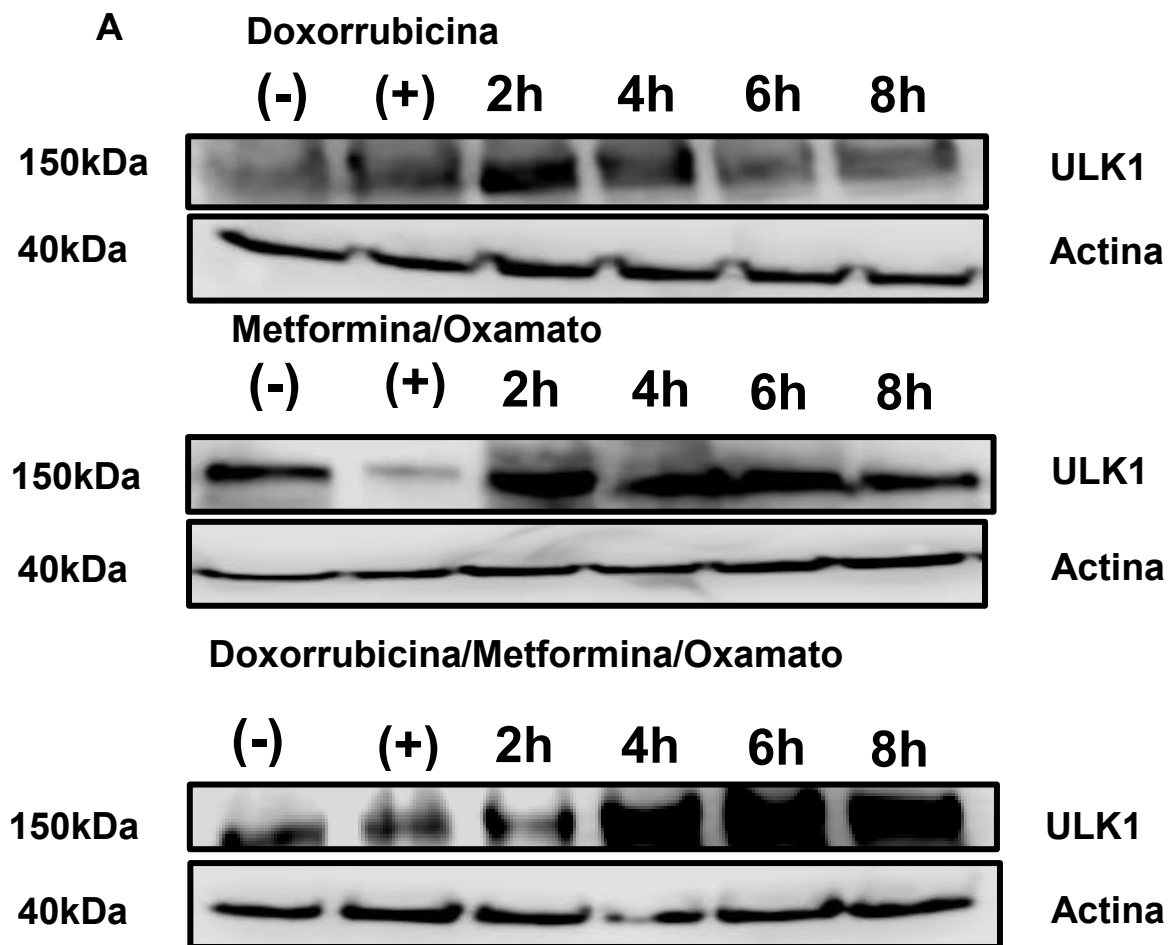


Figura 13.- Detección de la proteína ULK1 (A) mediante Western Blot a 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.

Asimismo se evaluó la expresión de otra de las proteínas esenciales del proceso de autofagia; ATG4b. Podemos observar que la detección de ATG4b no presenta cambios con los tratamientos de Doxorrubicina y Metformina/Oxamato; en comparación con la combinación de los tres fármacos, mostrando un aumento significativo en su detección en los 4 tiempos de exposición a la triple terapia (Figura 14).

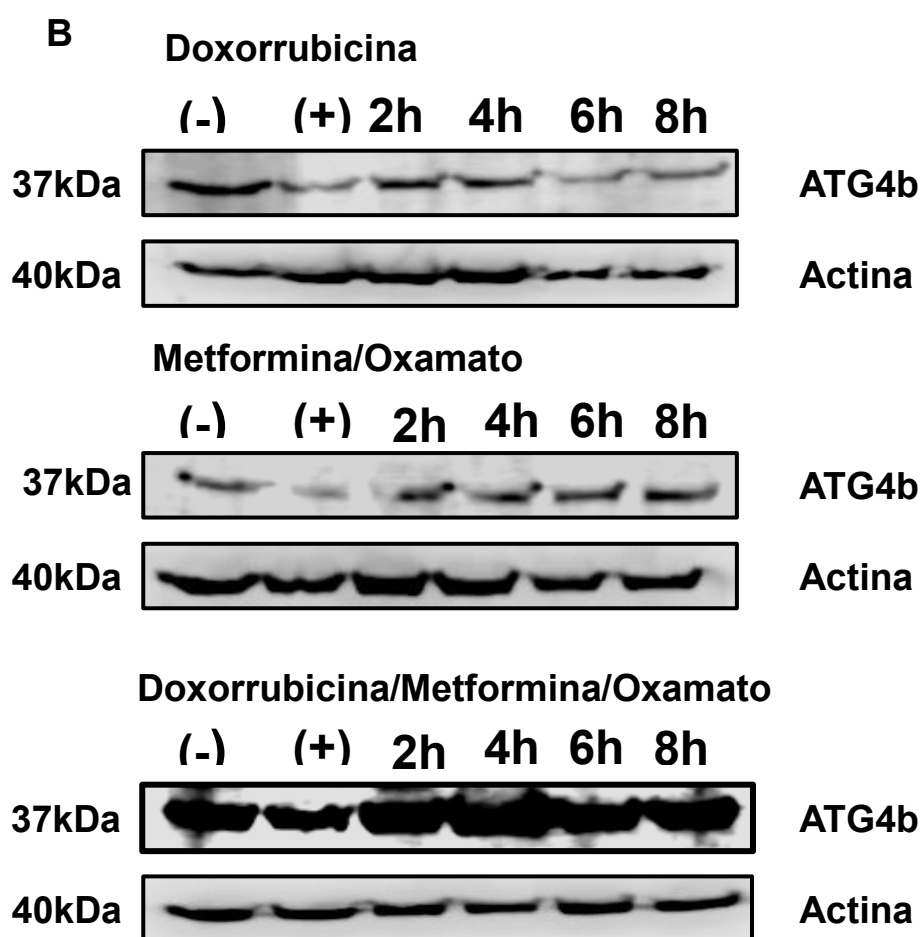


Figura 14.- Detección de la proteína ATG4b mediante Western Blot. (B) 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorrubicina, Metformina/Oxamato y Doxorrubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.

Finalmente se analizó la expresión de la proteína LC3 I y II. Esta proteína es un marcador importante en la autofagia; una característica determinante en el proceso final de la autofagia es la formación de vesículas de doble membrana denominadas autofagosomas, los cuales se forman por la conjugación de LC3I con fosfatidiletanolamina para formar LC3II lipidada, la cual se une a la membrana de los autofagosomas para completar la elongación y el cierre de esta vesícula. De acuerdo a lo anterior, en la figura 15 se observa que la línea celular tratada con Doxorubicina no aumenta los niveles de LC3II, mientras que con Metformina /Oxamato hay un ligero incremento en los niveles de detección. Sin embargo, de manera importante, en la combinación de los tres fármacos podemos observar que conforme aumenta el tiempo de exposición a estos fármacos la detección de LC3I disminuye mientras que la detección de LC3II aumenta significativamente en comparación con el control negativo (sin tratamiento).

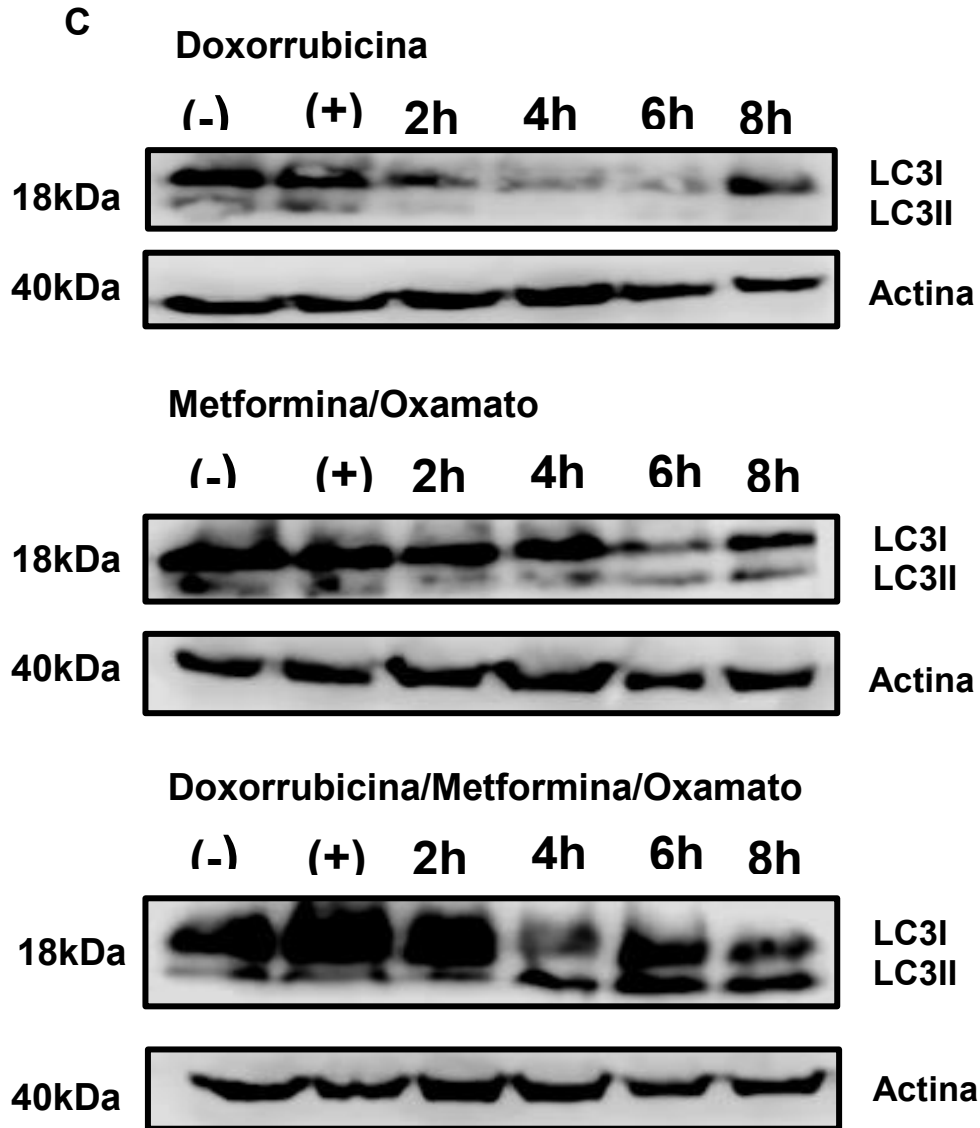


Figura 15.- Detección de la proteína LC3 I y II mediante Western Blot. (C) 2, 4, 6 y 8 horas de exposición con Doxorubicina, Metformina/Oxamato y Doxorubicina/Metformina/Oxamato en la línea celular HCT116.

Discusión

En este trabajo se evaluaron los niveles de expresión relativa de miR-101, miR-183 y miR-106a involucrados en la autofagia, mostrando una modificación en su expresión en la línea celular expuesta a los tratamientos en los diferentes tiempos, así como también se observó la detección de las proteínas esenciales involucradas en este proceso.

Los resultados mostraron que la combinación de los tres fármacos (Doxorrubicina, Metformina y Oxamato de sodio) induce autofagia, esto probablemente debido a que cada uno de estos fármacos actúan en diferentes vías de señalización involucradas en procesos biológicos como la proliferación celular, supervivencia y mantenimiento metabólico, bloqueando así diferentes proteínas esenciales para el desarrollo de estos procesos. La Metformina en sinergia con los otros dos fármacos indujo autofagia debido a que actúa sobre la vía AMPK/mTOR, este fármaco ejerce su función inhibiendo al complejo 1 de la mitocondria lo que conlleva a una activación de la proteína AMPK, que probablemente impide la fosforilación del complejo mTOR y por ende ULK1 estaría llevando a cabo la inducción de la autofagia (Cerezo et al, 2014). De manera importante cabe mencionar que la Metformina, un hipoglucemiante que reduce los niveles de glucosa en la sangre conlleva a la inhibición de factores de transcripción como EIF4E y provoca la disminución de la tasa metabólica (Shi et al., 2012). Por otra parte, el efecto del Oxamato de Sodio, a quien se le atribuye la función de inhibir la lactato deshidrogenasa (LDH-A), una enzima esencial en el proceso de

glucólisis, compite por el sitio activo de la LDH-A, impide la unión del piruvato y su conversión a lactato en el citosol, inhibiendo la acidosis láctica, un fenómeno común en el microambiente tumoral, además, también se le relaciona con la proliferación celular, metástasis y la inhibición de la respuesta inmune contra las células de cáncer (Zhao et al., 2015). Por lo tanto, una vez que se inhibe la síntesis de lactato, las células cancerígenas entran en un estado de estrés celular al no poder tomar nutrientes del medio, lo que probablemente resulta en la muerte celular por autofagia debido al déficit de nutrientes (Miskimins et al., 2014).

Por último, la Doxorubicina es un quimioterapéutico convencional el cual es un intercalante del DNA y a su vez inhibe la biosíntesis de ácidos nucleicos produciendo muerte celular, por lo tanto, podría estar induciendo muerte celular debido al daño al DNA en las células cancerosas (González, 2011).

Posteriormente, se evaluaron tres MicroRNAs involucrados en la autofagia (miR-106a, miR-101 y miR-183). Diversos estudios han demostrado que los microRNAs regulan diferentes funciones críticas en muchos procesos celulares y fisiológicos, tales como proliferación celular, diferenciación y muerte celular (Díaz et al., 2008). Tal es el caso de los miRNAs evaluados en este trabajo, donde los resultados nos demuestran que los niveles de expresión de estos miRNAs en células HCT116 en condiciones basales (sin tratamiento) presentan niveles altos. Esto se debe a que en el proceso de autofagia estos genes juegan un papel importante como oncogenes inhibiendo proteínas esenciales que participan en las diferentes etapas de este proceso para que se lleve a cabo (Fu et al., 2012). Por lo tanto, estos

niveles de expresión altos que presentan estos tres microRNAs se lo podemos atribuir a que las células en condiciones normales expresan estos genes y por lo tanto no se lleva un proceso de autofagia.

Por otra parte, cuando las células se exponen al tratamiento de los tres fármacos, el nivel de expresión de los miRNAs disminuye significativamente de manera dependiente del tiempo. Esto posiblemente se le puede atribuir al efecto de estos sobre las diferentes vías de señalización (AMPK/mTOR, glucólisis) que inhiben proteínas involucradas en procesos como proliferación, diferenciación y metástasis; bloqueando así los procesos de muerte celular. Por lo tanto una vez que inhibimos dichas proteínas con los fármacos podría estar induciéndose muerte celular por autofagia, lo que resulta en una disminución de estos microRNAs involucrados en este proceso, tal y como se observa en las figuras 10, 11 y 12. Posiblemente la disminución de estos microRNAs sea el primer paso seguido de la inducción de la autofagia dada por la activación de proteínas esenciales en este proceso como resultado de la disminución de los miRNAs, ya que en el 2012 Blandino et al, demostraron que la modulación de miRNAs podría ser parte del mecanismo de acción de la Metformina, esto debido, a que este fármaco inhibe la expresión de DICER influyendo directamente en la biosíntesis de los microRNAs. Por lo tanto, esta modulación de miRNAs subyace en las acciones metabólicas de la Metformina contra el cáncer. Por lo que se podría inferir que se está llevando a cabo un mecanismo similar con la combinación de los tres fármacos inhibiéndose estos miRNAs y posteriormente activando la autofagia. Cabe mencionar que hasta la fecha no existe alguna publicación que haya estudiado esta relación o el

mecanismo por el cual se da esta regulación entre la combinación de éstos 3 fármacos y los correspondientes microRNAs.

Asímismo, nuestros resultados también demuestran que los fármacos individualmente no afectan de manera significativa en la modificación de la expresión de estos miRNAs, lo que nos hace deducir que se necesita de un efecto sinérgico entre los tres fármacos, ya que al combinarlos se potencia la acción sobre sus proteínas blanco como LDH-A (Oxamato) y mTOR (Metformina) involucradas en vías de señalización esenciales para el desarrollo del tumor, inhibiendo estas y activando la autofagia.

Finalmente, para validar estos resultados se decidió conocer la expresión de proteínas involucradas en el proceso de autofagia y que pudieran estar reguladas por los microRNAs evaluados en este trabajo. La primera proteína que se evaluó fue ULK1, la cual participa en la primera etapa de la autofagia y es esencial la activación de esta para que se pueda llevar a cabo la inducción de este proceso (Wong et al., 2013). En los resultados obtenidos pudimos observar que con la combinación de los tres fármacos hay un aumento significativo en la detección de esta proteína en comparación con el control negativo. Sin embargo, podemos ver que con los tratamientos de Doxorrubicina y Metformina/Oxamato no hay cambio alguno. Esto posiblemente es a que ULK1 puede ser blanco de miR-106a, lo cual tiene sentido ya que como vimos anteriormente, con la combinación de los tres fármacos la expresión relativa de los miRNAs disminuye significativamente. Por lo tanto, el aumento en la detección de la proteína de ULK1 posiblemente se debe a

que una vez inhibida la expresión del miRNA la detección de su proteína blanco aumentó (Zhu et al., 2009), ya que la principal función de los miRNAs es inhibir la traducción de sus genes blancos que es lo que se observó en el control negativo del Western Blot de ULK1, donde no se está llevando a cabo autofagia. Por ende, se está expresando un determinado miRNA (en este caso miR-106a) que está inhibiendo a su gen blanco (ULK1). Sin embargo, cuando se aplica el tratamiento de los tres fármacos vemos una disminución en la expresión del miRNA lo que lleva a la activación de su gen blanco ULK1, lo que se ve reflejado en un aumento en la detección de esta proteína.

Otra proteína evaluada fue ATG4b, implicada en la etapa de elongación y cierre del autofagosoma, donde forma un complejo de reclutamiento para otros genes (ATG5 y ATG12) que participan en esta etapa (Satoo et al., 2009). Al igual que con ULK1, nuestros resultados demuestran que con la combinación de los tres fármacos aumenta la detección de esta proteína observándose de manera más evidente conforme incrementa el tiempo de exposición a estos fármacos. Xu y colaboradores (2013) comprobaron que ATG4b está sometido a regulación y es un blanco directo de miR-101, lo que se relaciona con lo observado en el Western Blot de ATG4b en donde se muestran niveles altos de esta proteína. Este resultado corresponde a lo reportado con este autor en el 2013.

Por último evaluamos la expresión de LC3 la cual funge como marcador del proceso de autofagia, ya que es esencial para el cierre y la completa maduración

del autofagosoma a través de su conjugación a su forma lipídica LC3II, la cual se une a la membrana de estas vesículas e induce el cierre de esta (Dancourt et al., 2014). Observamos en los resultados que la detección de la forma lipídica de LC3 (LC3II) presenta niveles altos con la combinación de los tres fármacos en comparación con el control negativo, esta detección se hace mas evidente a partir del tiempo de 4 horas donde observamos niveles mas altos de LC3II. Esto posiblemente se deba a que esta proteína pudiera ser un blanco directo de miR-183 y dada su inhibición por los fármacos, la detección de esta proteína aumenta.

Se sabe que los microRNAs juegan un papel importante como oncogenes en la autofagia y con base en nuestros resultados, podemos inferir que posiblemente esten regulando directamente proteínas esenciales involucradas en este proceso. Los resultados obtenidos nos permitieron observar que ésta combinación de fármacos podría ser eficiente para inducir este proceso biológico en células de CCR.

Dada la importancia del CCR, es necesario contar con métodos adecuados para dar un buen pronóstico y diagnóstico a esta enfermedad. La identificación de marcadores moleculares como los microRNAs ayudaría a elucidar redes de señalización involucradas en procesos biológicos y a su vez implementar terapias combinatorias farmacológicas que esten dirigidas a diversas proteínas esenciales involucradas en procesos que inhiban la progresión de la supervivencia de células cancerígenas.

Conclusiones

- 1) Se comprobó que la triple terapia farmacológica de Doxorrubicina/Metformina/Oxamato probablemente induce muerte celular por autofagia; lo que constituye un posible blanco para nuevas estrategias terapéuticas para pacientes con cáncer colorrectal (CCR).
- 2) Se conoció el nivel de expresión de microRNAs (miR-106a, miR-101 y miR-183) involucrados en el proceso de autofagia con la triple terapia a diferentes tiempos de exposición, resultando en la disminución de los niveles de expresión de estos miRNAs, lo que sugiere una gran importancia de estos genes como marcadores moleculares en la autofagia para un posible diagnóstico y pronóstico temprano.
- 3) Se detectó un aumento en la detección de proteínas como ULK1, ATG4b y LC3; marcadores importantes en el proceso de autofagiá. Su detección significativa, derivadas de la exposición de los tres fármacos en la linea celular de CCR, lo que sugiere que estas proteínas posiblemente pudieran ser blancos directos de los microRNAs evaluados en este trabajo.

Referencias

- 1) Alkın K., Murat G., Merva S., Vakur O., Semra D., Ümit T., Müjdat U. (2015). Effect of olive leaf extract treatment on doxorubicin-induced cardiac, hepatic and renal toxicity in rats. *Pathophysiology*, 22(2):117-23, doi: 10.1016/j.pathophys.2015.04.002
- 2) Anshushaug, M, Gynnild, M. A., Kaasa, S., Kvikstad, A., Gronberg, B. H. (2014). Characterization of patients receiving palliative chemo- and radiotherapy during end of life at a regional cancer center in Norway. *Acta Oncol*, 27:1-8, doi: 10.3109 / 0284186X.2014.948061.
- 3) Blandino G., Valerio M., Cioce M., Mori F., CasadeiL., Pulito C., Sacconi A., Biagioni F., Cortese G., Galanti S., Manetti C., Citro G., Muti P., Strano S. (2012). Metformin elicits anticancer effects through the sequential modulation of DICER and c-MYC. *Naturecommunications*, 3:865. DOI: 10.1038/ncomms1859
- 4) Bonfrate, L., Altomare, D. F., Di Lena, M., Travaglio, E., Rotelli, M. T., De Luca, A., & Portincasa, P. (2013). MicroRNA in colorectal cancer: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment. *J Gastrointestin Liver Dis*, 22(3): 311-320.
- 5) Calin, G. A., Croce and C. M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6(11): 857-866. doi: 10.1038/nrc1997

6) Cerezo M., TomicT, Ballotti R. and Rocchi S. Is it time to test biguanide metformin in the treatment of melanoma? (2014). *Pigment Cell Melanoma Res*, 28: 8-20. DOI: 10.1111/pcmr.12267

7) Chen Z., Lu W., García-Prieto C., Huang P (2007). The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr.* 39:267–274. DOI 10.1007/s10863-007-9086-x

8) Dancourt, J. Melia, and T. J. (2014). Lipidation of the autophagy proteins LC3 and GABARAP is a membrane-curvature dependent process. *Autophagy.* 10(8): 1470-1471. DOI: 10.4161/auto.29468

9) Díaz-Ruiz R., Rigoulet M., and Devin A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et Biophysica Acta.* 18(7): 568-76. DOI: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010

10) Esquela-Kerscher, A. Slack and F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*, (6): 259-69. doi: 10.1038/nrc1840

11) Feng, Y. Ke, C. Tang, Q. Dong, H. Zheng, X. Lin, W. Ke, J. Huang, J. Yeung, S. C. Zhang, H. (2014). Metformin promotes autophagy and apoptosis in

esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis*,(5): e1088. doi:10.1038/cddis.2014.59

12) Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2013. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.

13) Filipowicz, W. Bhattacharyya, S. N. Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nat Rev Genet*, (9): 102-14. doi: 10.1038/nrg2290

14) Finn, N. A., Findley, H. W., & Kemp, M. L. (2011). A switching mechanism in doxorubicin bioactivation can be exploited to control doxorubicin toxicity. *PLoS Comput Biol*, 7(9), e1002151. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002151

15) Fu, L. L., Wen, X., Bao, J. K., & Liu, B. (2012). MicroRNA-modulated autophagic signaling networks in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, 44(5):733-736. doi: 10.1016/j.biocel.2012.02.004

16) Gonzalez Martin, A. (2011). Safety profile of trabectedin in combination with liposomal pegylated doxorubicin in relapsed ovarian carcinoma: considerations for optimal management. *Int J Gynecol Cancer*, (21): S6-8. doi: 10.1097/IGC.0b013e318217b360

17) Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57-70.

18) Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5):646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013

19) Hill, J., Lawrence, J., Saba, C., Turek, M., Feldhaeusser, B., Coutermarsh-Ott, S., . . . Gogal, R., Jr. (2014). In vitro efficacy of doxorubicin and etoposide against a feline injection site sarcoma cell line. *Res Vet Sci*. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.07.006

20) Huo, H. Z., Zhou, Z. Y., Wang, B., Qin, J., Liu, W. Y., & Gu, Y. (2014). Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(2):406-412. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.099

21) Kala, R. Peek, G. W. Hardy, T. M. Tollefsbol, T. O. (2013). MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. *J Clin Bioinforma*, 3(6):1-8. doi: 10.1186/2043-9113-3-6

22) Lehraiki A., Abbe P., Cerezo M., Rouaud F., Regazzetti C., Chignon S. B., Passeron T., Bertolotto C., Ballotti R., Rocchi S (2014). Inhibition of Melanogenesis by the Antidiabetic Metformin. *Journal of Investigative Dermatology*, 13(4):2589–2597. doi:10.1038/jid.2014.202

23) Lin, Y. Zeng, Y. Zhang, F. Xue, L. Huang, Z. Li, W. Guo, M. (2013). Characterization of microRNA expression profiles and the discovery of novel microRNAs involved in cancer during human embryonic development. *PLoS One*. 8(8): e69230. doi:10.1371/journal.pone.0069230

24) Lopez-Camarillo, C., Marchat, L. A., Arechaga-Ocampo, E., Perez-Plasencia, C., Del Moral-Hernandez, O., Castaneda-Ortiz, E. J., & Rodriguez-Cuevas, S. (2012). MetastamiRs: Non-Coding MicroRNAs Driving Cancer Invasion and Metastasis. *Int J Mol Sci*, 13(2):1347-1379. doi: 10.3390/ijms13021347

25) Makinoshima H., Takita M., Saruwatari K., Umemura S., Obata Y., Ishii G., Matsumoto S., Sugiyama E., Ochiai A., Abe R., Goto K., Esumi H., Tsuchihara K (2015). Signaling through the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/ Mammalian Target of Rapamycin(mTOR) Axis is Responsible for Aerobic Glycolysis mediated

by Glucose Transporter in Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)-mutated Lung Adenocarcinoma. *J Biol Chem*. doi/10.1074/jbc.M115.660498

26) Manzano A and Segura-Pérez P. (2012). Colorectal Cancer Chemoprevention: Is This the Future of Colorectal Cancer Prevention?. *Sci.Wor.Jour*. 2012: 327-341. doi:10.1100/2012/327341

27) Mao Liu and Huiping Chen. (2010). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Journal of Genetics and Genomics*, 37:347–358. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60053-9

28) Mathew, R., and White, E. (2011). Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night. *Curr Opin Genet Dev*, 21(1):113-119. doi: 10.1016/j.gde.2010.12.008

29) Miskimins, W. K., Ahn, H. J., Kim, J. Y., Ryu, S., Jung, Y. S., & Choi, J. Y. (2014). Synergistic anti-cancer effect of phenformin and oxamate. *PLoS One*, 9(1): e85576. doi: 10.1371/journal.pone.0085576

30) Parasramka, M. A., Ho, E., Williams, D. E., & Dashwood, R. H. (2012). MicroRNAs, diet, and cancer: New mechanistic insights on the epigenetic actions of phytochemicals. *Mol Carcinog*, 51(3):213-230. doi:10.1002/Mc.20822

- 31)** Pritchard, C. C., Grady, W. M. (2011). Colorectal cancer molecular biology moves into clinical practice. *Gut*, 60(1):116-129. doi: 10.1136/gut.2009.206250
- 32)** Ramos, M., Esteva, M., Almeda, J., Cabeza, E., Puente, D., Saladich, R., . . . Llagostera, M. (2010). Knowledge and attitudes of primary health care physicians and nurses with regard to population screening for colorectal cancer in Balearic Islands and Barcelona. *BMC Cancer*, 10:500. doi: 10.1186/1471-2407-10-500
- 33)** Roy, S. and Debnath, J. (2010). Autophagy and tumorigenesis. *Semin Immunopathol*, (32):383–396. doi 10.1007/s00281-010-0213-0
- 34)** Satoo, K. Noda, N. N. Kumeta, H. Fujioka, Y. Mizushima, N. Ohsumi, Y. Inagaki, F. (2009). The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy. *EMBO J*. 28:1341–1350. DOI 10.1038/emboj.2009.80
- 35)** Shengtao Z., Linjie Z., Manchao K., Bingjie Z., Zhu L., Tao Y., Yuquan W., Xia Z. (2012). Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde?. *Cancer Letters*, 323:115–127. doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.017
- 36)** Schetter, A. J., Okayama, H., & Harris, C. C. (2012). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Cancer J*, 18(3):244-252. doi: 10.1097/PPO.0b013e318258b78f

- 37)** Shi, W. Y. Xiao, D. Wang, L. Dong, L. H. Yan, Z. X. Shen, Z. X. Chen, S. J. Chen, Y. Zhao, W. L. (2012). Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis*, (3): e275. doi: 10.1038/cddis.2012.13
- 38)** Suchorolski, M. T. Paulson, T. G. Sanchez, C. A. Hockenbery, D. Reid, B. J. (2013). Warburg and Crabtree effects in premalignant Barrett's esophagus cell lines with active mitochondria. *PLoS One*, 8(2):568-84. doi: 10.1371/journal.pone.0056884
- 39)** Takabatake, Y. Kimura, T. Takahashi, A. Isaka, Y. (2014). Autophagy and the kidney: health and disease. *Nephrol Dial Transplant*, 0: 1–9. doi: 10.1093/ndt/gft535
- 40)** Titone R., Morani F., Follo C., Vidoni C., Mezzanzanica D., Isidoro C. (2014). Epigenetic Control of Autophagy by MicroRNAs in Ovarian Cancer. *BioMed Research International*, 2014: 11pages. doi.org/10.1155/2014/343542
- 41)** Vichai V and Kirtikara K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc*. 1(3):1112-6.
- 42)** Vineis Paolo and Wild P C. (2014). Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet*, 383(13): 549-557. doi.org/10.1016/S0140-6736

43) Wang, B. S. Liu, Y. Z. Yang, Y. Zhang, Y. Hao, J. J. Yang, H. Wang, X. M. Zhang, Z. Q. Zhan, Q. M. Wang, M. R. (2013). Autophagy negatively regulates cancer cell proliferation via selectively targeting VPRBP. *Clin Sci (Lond)*, (124):203–214. doi: 10.1042/CS20120270

44) Wang, H. Zhao, L. Zhu, L. T. Wang, Y. Pan, D. Yao, J. You, Q. D. Guo, Q. L. (2014). Wogonin reverses hypoxia resistance of human colon cancer HCT116 cells via downregulation of HIF-1alpha and glycolysis, by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway. *Mol Carcinog*, (53): E107-18. doi: 10.1002/mc.22052

45) Winter, J. Jung, S. Keller, S. Gregory, R. I. Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, (11): 228-34. doi: 10.1038/ncb0309-228

46) Wong, P. M. Puente, C. Ganley, I. G. Jiang, X. (2013). The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy*. 9(2):124–137. DOI 10.4161/auto.23323

47) Xiaoming Z, Yang Y., Jianmei W., Ran Z. and Yiwei W (2013). Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest,apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncology*, 30:2983-2991. DOI: 10.3892/or.2013.2735

48) Xu, Y. An, Y. Wang, Y. Zhang, C. Zhang, H. Huang, C. Jiang, H. Wang, X. Li, X. (2013). miR-101 inhibits autophagy and enhances cisplatin-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 29: 2019-2024. DOI: 10.3892/or.2013.2338

49) Yang, Y. Su, D. Zhao, L. Zhang, D. Xu, J. Wan, J. Fan, S. Chen, M. (2014). Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*, 5(23):11886-96.

50) Zhai, Z., Wu, F., Chuang, A. Y., & Kwon, J. H. (2013). miR-106b fine tunes ATG16L1 expression and autophagic activity in intestinal epithelial HCT116 cells. *Inflamm Bowel Dis*, 19(11):2295-2301. doi: 10.1097/MIB.0b013e31829e71cf

51) Zhou, Y., Rideout, W. M., Bressel, A., Yalavarthi, S., Zi, T., Potz, D., Farlow, S., Brodeur, J., Monti, A., Reddipalli, S., Xiao, Q., Bottega, S., Feng, B., Chiu, M. I., Bosenberg, M., Heyer, J. (2014). Spontaneous Genomic Alterations in a Chimeric Model of Colorectal Cancer Enable Metastasis and Guide Effective Combinatorial Therapy. *PLoS One*, 9(8):e105886. doi: 10.1371/journal.pone.0105886.

52) Zhu, H., Wu, H., Liu, X., Li, B., Chen, Y., Ren, X., . . . Yang, J. M. (2009). Regulation of autophagy by a beclin 1-targeted microRNA, miR-30a, in cancer cells. *Autophagy*, 5(6):816-823.

