

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA,**  
**BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA**  
**MOLECULAR**



**TESIS DOCTORAL**  
**(PROGRAMA OFICIAL DE POSGRADO EN**  
**SEÑALIZACIÓN CELULAR)**

**“EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA**  
**EFICACIA DE LA AZATIOPRINA EN EL**  
**TRATAMIENTO DE TUMORES SÓLIDOS”**

**Francisco de Borja Hernández Breijo**  
**2013**

**Directores de tesis:**  
**Dr. Luis Alberto González Guijarro**  
**Dr. Francisco Javier Pérez Gisbert**



DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

PEDRO DE LA VILLA POLO, Director del Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá

INFORMA:

Que **D. Francisco de Borja Hernández Breijo** ha realizado la Tesis Doctoral titulada “Evaluación Preclínica de la eficacia de la Azatioprina en el tratamiento de tumores sólidos” bajo la dirección de los doctores **D. Luis Alberto González Guijarro** y **D. Francisco Javier Pérez Gisbert** en este departamento, dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 6 de Marzo de 2013

Dr. Pedro de la Villa Polo





DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA,  
BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

El **Dr. Luis Alberto González Guijarro**, profesor titular del Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, y el **Dr. Francisco Javier Pérez Gisbert**, profesor asociado del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Personal Médico del Hospital Universitario de la Princesa,

INFORMAN:

Que **D. Francisco de Borja Hernández Breijo** ha realizado la Tesis Doctoral titulada “**Evaluación Preclínica de la eficacia de la Azatioprina en el tratamiento de tumores sólidos**” bajo nuestra dirección en el Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá, dentro del programa de Doctorado “Señalización Celular” del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para proceder a su defensa pública.

Alcalá de Henares, a 6 de Marzo de 2013

Dr. Luis A. González Guijarro

Dr. Francisco J. Pérez Gisbert



*A mi familia*



Cuando uno empieza la tesis doctoral se cree que empleando todo su esfuerzo en llevar a cabo diversos experimentos, que en realidad sólo le están acercando a vislumbrar el tema en concreto de estudio, va a cambiar el mundo salvando la vida a miles de pacientes. Esa ilusión infantil generada por la ignorancia con la que uno empieza a dar los primeros pasos en el mundo de la investigación queda rápidamente disminuida al darse cuenta de que si fuese tan fácil, la gran cantidad de científicos que existen ya hubiesen acabado con el problema. Y cómo me dijo mi director de tesis, en aquella primera entrevista en su despacho "No creas que con esta tesis vas a conseguir acabar con todos los problemas, sólo conseguirás poner un pequeño ladrillo más en el objetivo de comprender el mecanismo de acción de la Azatioprina".

Creo que hemos sido capaces de arrojar un poco más de luz sobre el mecanismo de acción de este fármaco y de sugerir una posible y nueva aplicación del mismo; es decir colocar ese pequeño ladrillo en la construcción del edificio del conocimiento científico.

Tengo la obligación moral de dar las gracias a muchísimas personas y acontecimientos que han sido puestos en mi camino, como hitos en la montaña, y que me han ayudado a trazar el mismo, aunque a veces las ampollas de mis pies fuesen muy grandes, para llegar al punto en el que estoy ahora.

En primer lugar me gustaría agradecer al Dr. Luis González Guijarro por haberme acogido en su laboratorio y haberme guiado en todo momento durante esta tesis. De él he podido aprender muchas

*cosas prácticas para el día a día en el laboratorio, como a aplicar el método científico a la hora de trabajar. Además es una delicia charlar con él, aunque en ocasiones fuese un poco tarde y yo estuviese cansado, porque me permitía aprender escuchándole y éramos capaces de generar una gran tormenta de ideas provocando en mi un mayor gusto por la ciencia y aumentando mi motivación. También te agradezco Luis que te hayas preocupado por mi en tantas ocasiones, tanto en cosas personales como de trabajo. Muchas gracias porque eres un ejemplo en muchas cosas.*

*También me gustaría dar las gracias a las Dra. Lola Román y Lola Fernández porque me habéis apoyado mucho a lo largo de estos años y me habéis cuidado como si fuera vuestro "niño". Le daís mucha alegría al laboratorio y sois parte fundamental.*

*Muy importante ha sido la aportación de mi co-director de tesis, el Dr. Javier Pérez Gisbert, el cual ha aportado la financiación necesaria, que ha recompensado mi trabajo, y sin la cual todo se hubiese puesto cuesta arriba. Gracias por seguir considerando a la Azatioprina un fármaco digno de estudio.*

*Durante esta tesis he tenido muchos y variados compañeros a los cuales también estoy muy agradecido porque en mayor o menor medida me habéis aportado algo diferente. En primer lugar a los primeros que me acogisteis con mucho cariño, Arancha (nunca tx) y a Alberto. Nos hemos hecho grandes amigos y nos hemos apoyado mutuamente; aún recuerdo el día que por primera vez crucé la puerta*

*de vuestro laboratorio para presentarme, jeje... Gracias también a Nuria por su alegría y su sonrisa. A Claire y Juan Bueren, que fuimos compañeros de Master y aunque ahora cada uno seguimos un camino diferente en este mundo de la investigación, continuamos tratandonos con mucho cariño. Gracias a Diana por sus consejos. A Laura, Eva, Ceci, Luisito, Luisote, Mariam y demás compañeros que aún estáis o habéis estado por el departamento de Bioquímica, por vuestra cercanía.*

*A todos los que habéis pasado alguna vez por el laboratorio y me habéis acompañado en esta tesis. En primer lugar Eva, que me enseñaste los trucos de la electroforesis y del Western blot cuando venía en verano durante la carrera. Y por orden de aparición: A Sabrina (sie ist aus Deutschland), a Vero, a Sandra, a Irene García, a Irene Moreno, a Diana, a Laura, a Mamen, a Paloma (y agregado, jeje, un abrazo Juanma), a Jadeine (Juanita from London), a Patri, a David y a Yari. De aquí sólo habéis permanecido Patri y David, que habéis decidido continuar mi camino, os deseo lo mejor y os seguiré acompañando.*

*A todos los profesores del Departamento, a Miguel y a Angélica, y al personal de los distintos centros de apoyo a la investigación y al personal de la FGUA y de la OTRI.*

*A los compañeros del Hospital de la Princesa (Pablo, Almudena, Dra. Encarna Fernández-Contreras y Dra. María Chaparro), a los compañeros del Hospital Niño Jesús (Sandra y Dr. Vicente Barrios), a los compañeros del I.I.B. Alberto Sols (Dra. Ángela Valverde, Dra.*

*Águeda González-Rodríguez, Virginia y Maysa), al Dr. Jorge Monserrat y a la Dra. M<sup>a</sup> Val Toledo por vuestra ayuda durante esta tesis.*

*Muchas gracias a mis amigos, que me habéis apoyado y que siempre me preguntabais que qué tal las ratas; que aunque fuese así de tonto me sacaba una sonrisa. A Alberto y Javier por enseñarme e insistirme "que no me cansase nunca de estar empezando siempre", a Ester, a Dani, a Jaime, a José Manuel y a todos los que habéis estado cerca, en especial a Jesús y María. Gracias por todo.*

*Marta, sabes que tienes un hueco muy especial en esta tesis, te agradezco mucho tu compañía, tu apoyo y consuelo en los momentos que han sido más difíciles.*

*A mi familia, a la cual dedico esta tesis, en especial a mi madre, a mi madrina y a mi hermano, por su constante preocupación. Sobre todo a mi abuela Memé, a la que no pude explicar mi trabajo pero que ha cambiado mi manera de ver la vida por todo lo que me ha aportado estar al lado de ella.*

*Esto es para vosotros*



# ÍNDICE

<b>SUMMARY</b> -----	<b>17</b>
<b>GUÍA DE ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y NOMENCLATURA</b> -----	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> -----	<b>31</b>
<b>I- EL CÁNCER HEPÁTICO</b> -----	<b>33</b>
<b>I.1- Aspectos generales</b> -----	<b>33</b>
I.1.i- Epidemiología-----	<b>33</b>
I.1.ii- Etiopatogenia-----	<b>36</b>
<b>I.2- Clasificación anatómica de los tumores hepáticos</b> -----	<b>38</b>
<b>I.3- Diagnóstico clínico del cáncer de hígado</b> -----	<b>41</b>
I.3.i- Sintomatología-----	<b>41</b>
I.3.ii- Métodos de diagnóstico-----	<b>42</b>
I.3.iii- Clasificación clínica del hepatocarcinoma-----	<b>45</b>
<b>I.4- Procesos celulares implicados en la aparición         del tumor</b> -----	<b>50</b>
I.4.i- División celular-----	<b>51</b>
I.4.ii- Muerte celular-----	<b>57</b>
I.4.iii- Autofagia-----	<b>63</b>
I.4.iv- Senescencia celular-----	<b>68</b>
I.4.v- Estrés oxidativo-----	<b>70</b>
<b>I.5- Clasificación molecular del hepatocarcinoma</b> -----	<b>73</b>
<b>I.6- Tratamiento del hepatocarcinoma</b> -----	<b>85</b>
<b>II- AZATIOPRINA</b> -----	<b>93</b>
<b>II.1- Historia</b> -----	<b>93</b>

II.2- Estructura y propiedades químicas-----	93
II.3- Indicaciones terapéuticas-----	94
II.4- Posología-----	96
II.5- Interacciones y efectos adversos-----	96
II.6- Farmacocinética-----	97
II.7- Farmacodinamia-----	99
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS-----</b>	<b>105</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>CAPÍTULO I-----</b>	<b>109</b>
<b>Caracterización de la autofagia inducida por azatioprina en células de hepatoblastoma (HepG2).</b>	
<b>ARTÍCULO I</b>	
Luis G. Guijarro, Irene D. Román, M <sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno, Javier P. Gisbert, Borja Hernández-Breijo. <b>Is the autophagy induced by thiopurines beneficial or deleterious?.</b> <i>Current Drug Metabolism</i> 2012; 13: 1267-1276.	
<b>CAPÍTULO II-----</b>	<b>117</b>
<b>Efecto de la azatioprina sobre la señalización celular del IGF-1 en células de hepatoblastoma (HepG2).</b>	
<b>ARTÍCULO II</b>	
Borja Hernández-Breijo, Jorge Monserrat, Irene D. Román, Águeda González-Rodríguez, M <sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno, Ángela M. Valverde, Javier P Gisbert, Luis G. Guijarro. <b>Azathioprine desensitizes hepatoblastoma cells to IGF-I and causes apoptosis when is combined with bafilomycin A1.</b> <i>Cancer Research</i> 2013 (ENVIADO).	

**CAPÍTULO III**-----129

**Evaluación preclínica de la combinación de azatioprina y L-butionina-(R, S)-sulfoximina para el tratamiento del cáncer de hígado y de colon.**

**ARTÍCULO III**

Borja Hernández-Breijo, Jorge Monserrat, Sara Ramírez-Rubio, Eva P. Cuevas, Diana Vara, Inés Díaz-Laviada, M<sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno, Irene D. Román, Javier P. Gisbert, Luis G. Guijarro. **Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma.** *World Journal of Gastroenterology* 2011; 17: 3899-3911.

**PATENTE**

**Uso de una combinación de Azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario**

**DISCUSIÓN GENERAL**-----139

**CONCLUSIONES**-----147

**ANEXOS**-----149

**ANEXO I**-----151

**Capítulo de libro: La azatioprina produce autofagia en células HepG2**

**ANEXO II**-----165

**Gertrude Bell Elion, una biografía indispensable.**

**ANEXO III**-----171

**Comunicaciones a congresos**

**ANEXO III**-----175

**Financiación**

**BIBLIOGRAFÍA**-----177



Universidad  
de Alcalá

# *SUMMARY*

---

---

*"Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto, y pensar lo que nadie más ha pensado"*

**Albert Szent-Györgi**



## **BACKGROUND**

Azathioprine (AZA) is a molecule that belongs to the thiopurines family. It is an immunosupresor widely used for autoimmune diseases treatment and to avoid transplant rejection. Liver cancer is the sixth most common cancer worldwide with 692000 deaths a year, being the third most lethal cancer in men and the sixth in women. BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) is a staging system that allows clearly identification of the tumour stage in order to select the best treatment in each case. Nowadays, it is a key step in the knowledge of the molecular mechanism involved in oncogenesis, to get a correct diagnosis to apply a personal treatment with the combination of classical and new drugs.

Solid tumours, show resistance to irradiation and to chemotherapy due to the exacerbation of stimulatory autocrine loops (i.e. by production of IGF-1) as well as the elevation of the antioxidant systems (i.e by overproduction of GSH), which provide resistance against cell death. Therefore, drugs that decrease the effects of both agents could be useful in the treatment of cancer.

## **AIMS**

First, to evaluate the efficacy and toxicity of AZA in the treatment of solid tumours (namely liver cancer). Second, to study the molecular mechanism involved in the action of AZA.

## **MATERIALS AND METHODS**

Classical biochemistry and molecular biology methods were used to study the efficacy, toxicity and the molecular mechanism involved in the effects of AZA on two cancer models: a) *in vitro*, using several cultured cell lines (HepG2, HuH6, Hep3B, HuH7, Chang, neonatal hepatocytes, RKO, SW-480, SW-48, LoVo); and b) *in vivo*, using a xenograft mouse model of cancer.

## RESULTS AND CONCLUSIONS

The experiments carried on during this thesis have determined that AZA induces autophagy in a model of human hepatoblastoma (HepG2 cells). This effect is triggered by sustained activation of p70S6K, through Ras/Raf/MEK/ERK/TSC-2/mTOR signalling pathway, which leads to the degradation of IRS-1 in the proteasome and the subsequent desensitization of the cell to IGF-1. The resistance to IGF-1 could be the cause of autophagy stimulation, cell cycle arrest and increase of cellular senescence, observed after treatment with AZA. However, the cells do not die as a consequence of drug treatment. Interestingly, when the thiopurine was combined with bafilomycin A1 (BAF), a specific inhibitor of lysosomal-type H<sup>+</sup>-ATPase, the cells died by apoptosis because they cannot degrade the damaged structures.

Moreover, when cancer cells were treated with a combination of AZA and L-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), a specific inhibitor of GSH synthesis, cells died by necrosis, in a caspase-3-independent manner, but in a dependent path from mitochondria integrity and from stress kinases (p38 and JNK) activation. These data suggest a cell death regulated mechanism, known as necroptosis. When cancer cells (HepG2) were introduced subcutaneously in immunosuppressed mice, a development of a tumor was observed, whose volume increased with time. The intratumoural treatment with AZA plus BSO produced the significant decreased of their volume with respect to the animals treated with the excipient (DMSO) alone. The safety studies using biochemical methods, show a moderate effect of AZA plus BSO with respect to DMSO group.

In conclusion, AZA in combination with autophagy inhibitors (i.e. BAF) or with glutathione depletors (i.e. BSO) could be useful for the treatment of solid tumours from liver and gastrointestinal origin.





Universidad  
de Alcalá

## *ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS, SIGLAS Y NOMENCLATURA*

---

---

*“A aquellos que dicen que algo es  
imposible, sólo les pido que no molesten a  
los que lo estamos intentando”*

**Thomas Alva Edison**



<b><math>\Delta\psi_m</math></b>	Diferencia de potencial mitocondrial
<b>3-MA</b>	3-Metiladenina
<b>4EBP1</b>	Proteína “ <i>Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1</i> ”
<b>6-MMP</b>	6-metilmercaptopurina
<b>6-MP</b>	6-mercaptopurina
<b>6-MTG</b>	6-metiltioguanina
<b>6-TG</b>	6-tioguanina
<b>6-TGN</b>	6-tioguanin nucleótidos
<b>ActD</b>	Actinomicina D
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AFP</b>	Alfa fetoproteína
<b>AIF</b>	Factor inductor de la apoptosis
<b>AKT</b>	PKB/proteína quinasa B
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AP1</b>	Proteína activadora 1
<b>Apaf</b>	Factor activador de la peptidasa apoptótica
<b>APC</b>	Proteína de la poliposis adenomatosa
<b>APC</b>	Complejo promotor de la anafase
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	ARN mensajero
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>Atg</b>	“ <i>autophagy-related gene</i> ”
<b>ATM</b>	Proteína “ <i>ataxia telangiectasia, mutated</i> ”
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATR</b>	Proteína “ <i>ataxia telangiectasia and Rad3-related</i> ”
<b>ATRIP</b>	“ <i>ATR interacting protein</i> ”
<b>AXIN 1</b>	Axina 1
<b>AZA</b>	Azatioprina
<b>Bad</b>	Proteína “Bcl-2-associated death promoter”
<b>BAF</b>	Bafilomicina A1

<b>Bak</b>	Proteína “ <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> ”
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl-2
<b>Bcl-2</b>	Proteína “ <i>B-cell lymphoma 2</i> ”
<b>Bcl-w</b>	Proteína 2 similar a Bcl-2
<b>Bcl-XL</b>	Proteína “ <i>B-cell lymphoma-extra large</i> ”
<b>Bfl-1</b>	Proteína “ <i>BCL2-related protein A1</i> ”
<b>Bid</b>	Proteína “ <i>BH3-interacting domain death agonist</i> ”
<b>Bik/Nbk</b>	Proteína “ <i>Bcl-2-interacting killer</i> ”
<b>Bim/Bod</b>	Proteína 11 similar a Bcl-2
<b>Bmf</b>	Proteína “ <i>Bcl-2-modifying factor</i> ”
<b>Bok/Mtd</b>	Proteína “ <i>Bcl-2-related ovarian killer protein</i> ”
<b>Boo/Diva</b>	Proteína 10 similar a Bcl-2
<b>BSO</b>	L-butionina-[S,R]-sulfoximina
<b>c-kit</b>	Protooncogen kit
<b>c-met</b>	Protooncogen met (codifica HGFR)
<b>Caspasa</b>	Cisteína aspartato proteasa
<b>CAT</b>	Catalasa
<b>CD</b>	“Cluster of differentiation”
<b>Cdc6</b>	Fosfatasa dual específica 6 del ciclo de división celular
<b>Cdc25</b>	Fosfatasa dual específica 25 del ciclo de división celular
<b>Cdc42</b>	Fosfatasa dual específica 42 del ciclo de división celular
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina
<b>CDKN2A</b>	Inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A
<b>CEA</b>	Antígeno carcino-embriionario
<b>CHEK1</b>	Homólogo del checkpoint CHK
<b>Cit c</b>	Citocromo c
<b>CK</b>	Creatina quinasa
<b>CMA</b>	Autofagia mediada por chaperonas
<b>CTNNB1</b>	Gen de la $\beta$ -catenina
<b>CYLD</b>	Proteína “ <i>Lys63-deubiquitylating enzyme cylindromatosis</i> ”

<b>DCP</b>	Des- $\gamma$ -carboxiprotrombina
<b>Dhh</b>	Proteína “ <i>Desert hedgehog homolog</i> ”
<b>DISC</b>	Complejo de señalización inductor de muerte celular
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DR3</b>	Receptor de muerte 3
<b>E2F</b>	Factor de transcripción de unión a Rb
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EGFR</b>	Receptor de EGF
<b>eIF4E</b>	Factor de iniciación eucariótico 4E
<b>ERK</b>	Quinasa regulada por señales extracelulares
<b>FAD</b>	Flavín adenín dinucleótido
<b>FADD</b>	Proteína del dominio del muerte asociado a Fas
<b>Fas</b>	Miembro 6 de la superfamilia de TNFR
<b>FASL</b>	Ligando de Fas
<b>FKHR</b>	Proteína "forkhead"
<b>FLT3</b>	Proteína “ <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i> ”
<b>FMN</b>	Flavín mononucleótido
<b>Fos</b>	Protooncogen fos
<b>FOXO</b>	“ <i>forkhead transcription factor O</i> ”
<b>GCS</b>	Gamma-glutamilcisteinil sintetasa
<b>GFR</b>	Receptor de factor de crecimiento
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GHRH</b>	Hormona liberadora de la hormona del crecimiento
<b>Gli</b>	Oncogen asociado a glioma
<b>GMPS</b>	Guanosina monofosfato sintetasa
<b>GPC3</b>	Glipicano-3
<b>GPDA</b>	Glicilprolina dipeptidil aminopeptidasa
<b>GPX</b>	Glutation peroxidasa
<b>Grb2</b>	Proteína “growth factor receptor-bound protein 2”
<b>GSH</b>	Glutation

<b>GSK3<math>\beta</math></b>	Glucógeno sintasa quinasa-3 $\beta$
<b>GSSG</b>	Disulfuro de glutation
<b>GST</b>	Glutation-S-transferasa
<b><math>\gamma</math>-GT</b>	Gamma glutamil transpeptidasa
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>GTP <math>\gamma</math>S</b>	guanosina 5'-O-[gamma-tio]trifosfato
<b>G<math>\beta</math>L/mLST8</b>	Proteína asociada a mTOR, homologa de LST8
<b>HCC</b>	Carcinoma hepatocelular
<b>HER2</b>	Receptor-2 de factor de crecimiento epidérmico humano
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de los hepatocitos
<b>HGFR</b>	Receptor de HGF
<b>HGPRT</b>	Hipoxantina-guanosina-fosforribosiltransferasa
<b>hMLH1</b>	“ <i>MutL protein homolog 1</i> ”
<b>hMSH2</b>	“ <i>MutS protein homolog 2</i> ”
<b>Hrk/DP5</b>	Proteína <i>Harakiri</i>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IGF</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina
<b>IGF-R</b>	Receptor de IGF
<b>IGFBP</b>	Proteína de unión al IGF
<b>Ihh</b>	Proteína “ <i>Indian hedgehog homolog</i> ”
<b>IMPDH</b>	Inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa
<b>IRS</b>	Sustrato del receptor de insulina
<b>JAK</b>	Quinasa Janus
<b>JC-1</b>	Yoduro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil-imidacarbocianina
<b>JNK</b>	Quinasa c-jun N-terminal
<b>Jun</b>	Protooncogen jun
<b>KRAS2</b>	Oncogén Kirsten homologo del sarcoma de rata
<b>LC-3</b>	Proteína “ <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i> ”
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LT-<math>\beta</math></b>	Linfotoxina $\beta$

<b>Km</b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>MAPK</b>	Proteína quinasa activada por mitógenos
<b>Mcl-1</b>	Proteína “ <i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i> ”
<b>Mdr1</b>	Gen que codifica la glicoproteína P
<b>MEK</b>	Proteína quinasa quinasa activada por mitógenos
<b>mLST8/GβL</b>	“ <i>TORC subunit LST8/G protein beta subunit-like</i> ”
<b>MMR</b>	Sistema “ <i>DNA mismatch repair</i> ”
<b>MTGMP</b>	Metiltioguanina monofosfato
<b>MTIMP</b>	Metiltioinosina monofosfato
<b>m-TOR</b>	Proteína “ <i>mammalian target of Rapamycin</i> ”
<b>mTORC1</b>	Complejo 1 de mTOR
<b>mTORC2</b>	Complejo 2 de mTOR
<b>MTT</b>	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
<b>Myc</b>	Protooncogen myc
<b>NAC</b>	N-acetilcisteína
<b>NAD</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido
<b>NADP</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NORE1A</b>	Gen supresor de tumores homólogo a RASSF1A
<b>NORE1B</b>	Gen supresor de tumores homólogo a RASSF1B
<b>OX40</b>	Miembro 4 de la superfamilia de TNFR
<b>p70S6K</b>	Quinasa de la proteína ribosomal S6
<b>p85</b>	Subunidad reguladora de la PI3K
<b>p110</b>	Subunidad catalítica de la PI3K
<b>PARP</b>	Polimerasa de poli-ADP-ribosa
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PDGFR</b>	Receptor de PDGF
<b>PDK</b>	Quinasa dependiente de fosfoinosítidos
<b>PEI</b>	Inyección percutánea de etanol
<b>PH</b>	Dominio de homología con pleckstrina
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol-3-quinasa

<b>Pim</b>	Proteína “ <i>Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase Pim</i> ”
<b>PIP2</b>	Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
<b>PIP3</b>	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
<b>PIK3CA</b>	Gen que codifica la subunidad catalítica de la PI3K (p110)
<b>PIVKA II</b>	Proteína inducida por ausencia de vitamina K
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PPAT</b>	Fosforibosil-pirofosfato aminotransferasa
<b>PTB</b>	Dominio de unión a fosfotirosina
<b>PTEN</b>	Proteína homóloga de fosfatasa y tensina
<b>Rac</b>	Proteína GTPasa pequeña Rac
<b>Raf</b>	Protooncogen serina/treonina quinasa
<b>Rap</b>	Rapamicina
<b>Raptor</b>	Proteína reguladora asociada de mTOR
<b>Ras</b>	Proteína GTPasa pequeña ras
<b>Rb</b>	Proteína del retinoblastoma
<b>RF</b>	Radiofrecuencia
<b>RF</b>	Riboflavina
<b>RFK</b>	Riboflavin quinasa
<b>Rheb</b>	Homologo enriquecido de Ras en el cerebro
<b>Rho</b>	Proteína GTPasa pequeña Rho
<b>Rictor</b>	Proteína acompañante, insensible a rapamicina, de mTOR
<b>RIP</b>	“receptor-interacting protein kinase”
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>rt-qPCR</b>	Retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>Shh</b>	Proteína “ <i>sonic hedgehog</i> ”
<b>SHP2</b>	Proteína tirosina fosfatasa 2 que contiene el dominio SH2
<b>siRNA</b>	“ <i>Small interfering RNA</i> ”
<b>Smac</b>	Proteína “ <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> ”
<b>DIABLO</b>	Proteína “ <i>Direct IAP-binding protein with low pI</i> ”



<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>Sos</b>	Proteína "Son of Sevenless"
<b>SS</b>	Somatostatina
<b>STAT</b>	Proteína " <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i> "
<b>TAC</b>	Tomografía axial computerizada
<b>TACE</b>	Quimioembolización transarterial
<b>TERT</b>	Transcriptasa reversa de la telomerasa
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>TIMP</b>	Tioinosina monofosfato
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>TGMP</b>	Tioguanina monofosfato
<b>TPMT</b>	Tiopurina metil transferasa
<b>TRAF</b>	Factor asociado al receptor de TNF
<b>TRAIL</b>	Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
<b>TRAMP</b>	Miembro 25 de la superfamilia del TNFR
<b>TSC</b>	Complejo proteico de la esclerosis tuberosa
<b>TXMP</b>	tioxantina monofosfato
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b>VEGFR</b>	Receptor de VEGF
<b>Vps34</b>	PI3K de clase III, proteína vacuolar 34
<b>Wnt</b>	Proteína proto-oncogénica Wnt (Wingless)
<b>XO</b>	Xantina oxidasa





Universidad  
de Alcalá

# *INTRODUCCIÓN*

---

---

*“A la verdad se llega no sólo por la razón  
sino también por el corazón...”*

**Blaise Pascal**

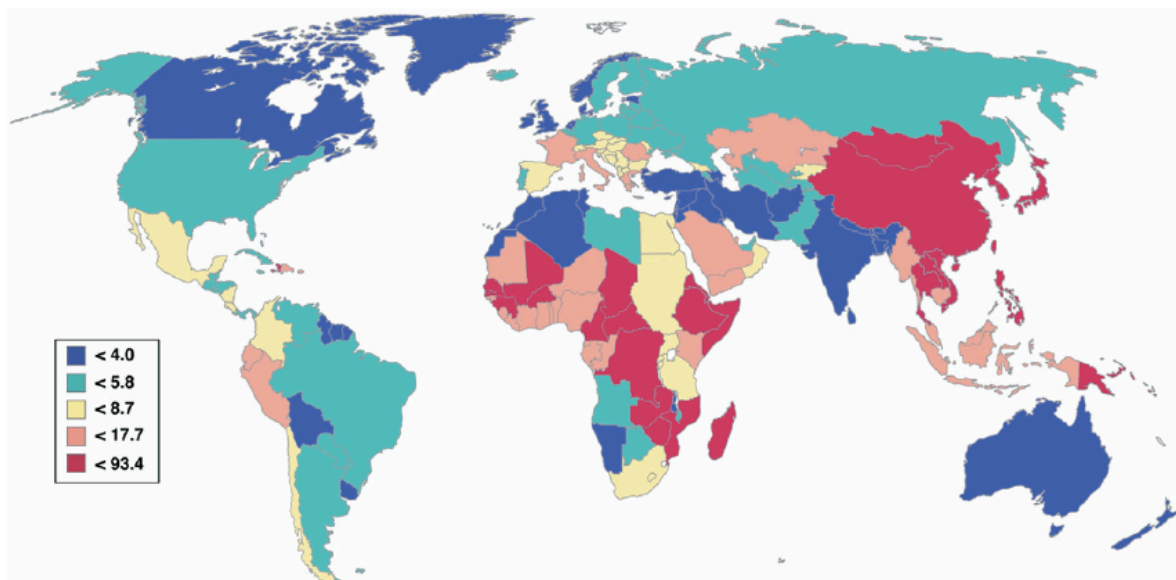


## I. EL CÁNCER HEPÁTICO

### I.1 Aspectos generales

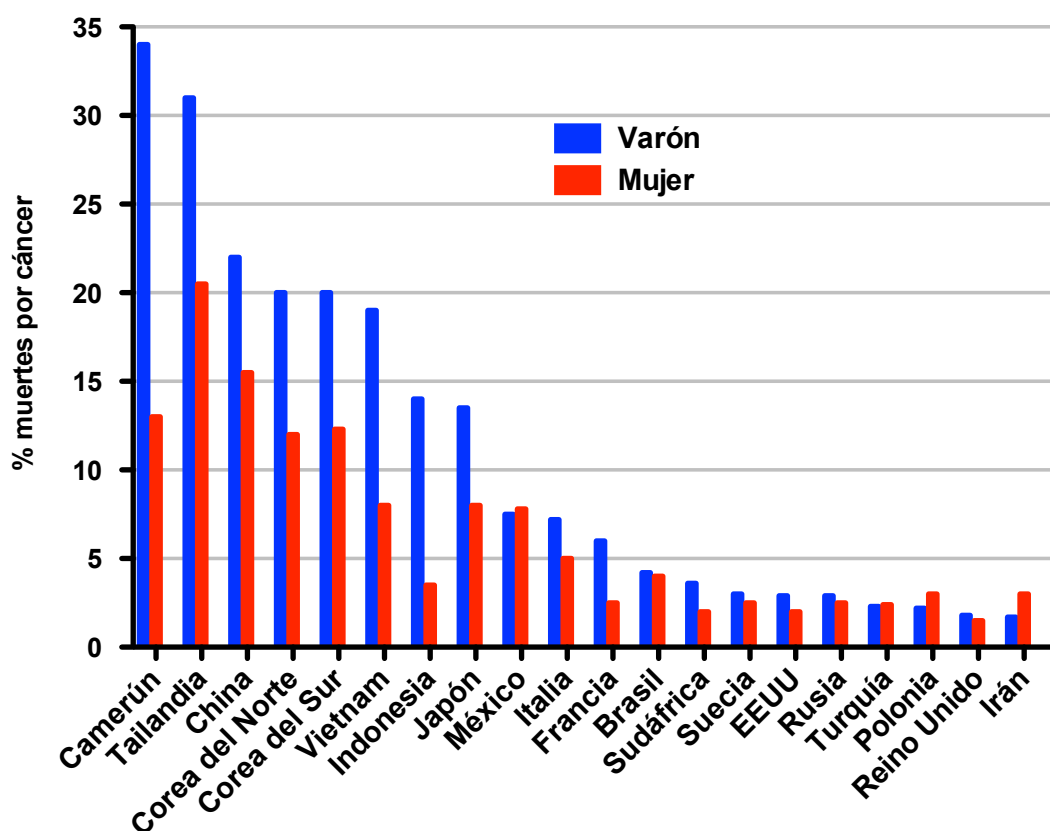
#### I.1.i Epidemiología

La incidencia de cáncer de hígado ocupa el sexto lugar en el mundo dentro del conjunto de las neoplasias y constituye la tercera causa de mortalidad en el varón, por detrás del cáncer de pulmón y del cáncer de estómago. En la mujer es la sexta causa de mortalidad. Representa aproximadamente el 4% de los nuevos casos de cáncer que se diagnostican anualmente en el mundo. Tiene una tasa de supervivencia a cinco años del 7% y estimaciones de la Organización Mundial de la Salud indican que anualmente se diagnostican alrededor de 749.000 de nuevos casos que provocan 692.000 muertes en todo el mundo. Su incidencia varía significativamente tanto entre las distintas regiones geográficas, como entre los diferentes grupos étnicos y raciales, con una incidencia mayor en el sudeste asiático y en el África subsahariana [Jemal A et al, 2011] [Parkin DM et al, 2005] [EASL-EORTC, 2012].



**Fig.1:** Variaciones regionales de las ratios de mortalidad por hepatocarcinoma. Casos por cada 100.000 personas. (Extraído de El-Serag et al, 2007)

El mayor índice de mortalidad por cáncer hepático se da en Camerún, Tailandia, China, Corea del Norte, Corea del Sur y Vietnam; sin embargo en China es donde se registra un mayor número de muertes por esta enfermedad debido a la gran densidad de población que posee [Nordenstedt H et al, 2010]. En Camerún y en Tailandia alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se deben a cáncer de hígado, en cambio en la mayoría de los países occidentales (Europa y América del Norte) el cáncer de hígado supone menos de un 5% del total de los diferentes tipos de cáncer [Nordenstedt H et al, 2010].



**Fig.2: Porcentaje de muertes ocasionadas por cáncer de hígado en diferentes países, en función del sexo. Gráfica de mortalidad por países. (Extraído de Nordenstedt H et al, 2010)**

La similitud existente entre los valores de mortalidad y de incidencia del cáncer de hígado son indicativos de la reducida supervivencia que presentan la mayoría de los pacientes que padecen esta enfermedad. La corta supervivencia de los pacientes con este tipo de cáncer, está relacionada con la ausencia de síntomas observables en la fase temprana de la enfermedad, con su naturaleza agresiva, con la descompensación

metabólica que se produce con el desarrollo de la enfermedad y con la limitada disponibilidad de opciones terapéuticas. Los pacientes que presentan los síntomas de la enfermedad normalmente se encuentran en una fase avanzada en la que los efectos de los tratamientos son muy limitados e ineficaces. En los países occidentales, la enfermedad se diagnostica en sus estadios iniciales en un 30-40% de los pacientes, lo que posibilita que reciban un tratamiento potencialmente curativo, mediante terapias quirúrgicas (resección y trasplante hepático) o procedimientos locoregionales (ablación por radiofrecuencia).

Cuando los pacientes se diagnostican precozmente, la supervivencia, a cinco años, es del 60-70% [Llovet JM et al, 2003]. Sin embargo, cuando la enfermedad se diagnostica en estadios avanzados, el pronóstico empeora porque en la actualidad no se dispone de medidas efectivas para frenar el desarrollo de la enfermedad [Bruix J et al, 2001]. En el momento actual, tan sólo el tratamiento sistémico con Sorafenib aumenta la supervivencia de pacientes con cáncer de hígado en estado avanzado de un modo significativo [(C) Llovet JM et al, 2008].

La edad de aparición del cáncer de hígado varía según la región, el género y la etiología [Parkin DM et al, 2005]. En la población occidental, que presenta bajo riesgo y alta esperanza de vida, la frecuencia de aparición de la enfermedad aumenta a partir de los 75 años. Un patrón parecido se observa en la población asiática de Hong Kong; sin embargo, en la población masculina de Gambia o Mali, se observa un aumento de la aparición de la enfermedad a los 60 años. En otros lugares de África, como en Sudáfrica y en Egipto, la edad media de aparición coincide con la de los países occidentales [<http://www.who.int/whosis>]. Esta variabilidad en la edad de aparición de la enfermedad se debe principalmente a las diferencias de edad a las que se produce el contagio de la hepatitis B o C. Las diferencias étnicas también influyen en la incidencia del cáncer de hígado. En un estudio realizado en Estados Unidos, los individuos de etnias provenientes de Asia tenían 1.5 veces más probabilidades de padecer cáncer de hígado que individuos de raza negra, 1.7 veces más probabilidad que individuos de etnia hispana y 3 veces más probabilidad que individuos de raza blanca [Altekruse SF et al, 2009]. Además de las diferencias regionales, el cáncer hepático es mucho más frecuente en los hombres que en las mujeres, con una relación de 3:1 aproximadamente. Se piensa que estas diferencias están asociadas a una mayor exposición a factores de riesgo y a los

mayores niveles de andrógenos propios del sexo masculino. Diversos estudios apuntan a la existencia de una asociación positiva entre los niveles de testosterona circulante y el desarrollo del cáncer de hígado en varones con hepatitis B [El-Serag HB et al, 2007], [Yu MW et al, 2003].

### I.1.ii Etiopatogenia

Los principales factores de riesgo relacionados con el desarrollo del cáncer de hígado son: la exposición a los virus de la hepatitis B y C, el consumo excesivo de alcohol, la ingesta de alimentos contaminados por aflatoxinas y padecer obesidad y/o diabetes.

i). **Hepatitis B:** El virus de la hepatitis B es altamente contagioso y se transmite a través de la sangre y de otros fluidos corporales de un individuo infectado. Según los datos de la Organización Mundial de la Salud alrededor de 350 millones de personas en todo el Mundo están infectados de este virus de manera crónica. Se especula, que el origen del 50 % de los casos de hepatocarcinoma están asociados a esta patología [Parkin DM, 2006]. En Corea del Sur dicha asociación alcanza un 70% de los casos de hepatocarcinoma, mientras que en Japón se reduce a un 15% de los casos sin que se conozca la causa de dicha diferencia [Kim SR et al, 2008]. En Europa varía por territorios: en Grecia el 55% de los pacientes con hepatocarcinoma están infectados de hepatitis B, mientras que en Italia supone un 19%, en Suecia un 3% y en Estados Unidos un 9% de los casos. El hepatocarcinoma asociado a la hepatitis B se diagnostica, como término medio, después de 25 a 30 años del inicio de la infección [Lee WM, 1997]. En la gran mayoría de los casos, entre un 70-90%, el cáncer de hígado asociado a hepatitis B se desarrolla con posterioridad a la cirrosis [El-Serag HB et al, 2006].

ii). **Hepatitis C:** La asociación entre la hepatitis C y el aumento en la incidencia del hepatocarcinoma ha sido demostrado en multitud de estudios clínicos. La presencia del virus en el hepatocarcinoma es el mayor factor de riesgo en los países occidentales y en el Japón (80-90%). Se ha estimado que el virus de la hepatitis C se expandió entre los jóvenes en Norteamérica (en los años sesenta y setenta) a consecuencia de la utilización de agujas contaminadas [Armstrong GL et al, 2000]. El



virus se propagó a través de la donación de sangre hasta que se desarrolló el test para detectarlo en 1990. Después de este hecho se redujeron de manera drástica las nuevas infecciones por el virus. La hepatitis C incrementa el riesgo a sufrir cáncer de hígado porque provoca fibrosis hepática y ocasionalmente cirrosis.

iii). **Alcohol:** El consumo elevado de alcohol, de más de 50 a 70 g al día y durante periodos prolongados, está relacionado con el riesgo de padecer cáncer de hígado. La mayoría de los datos existentes indican que por sí mismo el alcohol no tiene efectos carcinogénicos aunque colabora con el virus de la hepatitis B o C en el desarrollo de la cirrosis, la cual puede derivar en el hepatocarcinoma [Donato F et al, 2002].

iv). **Aflatoxinas:** Dichas sustancias son micotoxinas altamente carcinogénicas, en especial la aflatoxina B1, producidas por algunas especies de hongos del género *Aspergillus flavus*. Dichos microorganismos crecen en un gran número de alimentos como el maíz, la mandioca o los cacahuetes. Su incidencia es mayor en África subsahariana y en el sudeste asiático, donde el consumo de comida contaminada con aflatoxinas es frecuente, por lo que la frecuencia de aparición de hepatocarcinoma tiende a aumentar. Dichas aflatoxinas pueden provocar mutaciones genéticas en el 30-60% de los casos de cáncer de hígado [Zhang YJ et al, 2005]. Además, se ha encontrado un efecto sinérgico entre el virus de la hepatitis B y las aflatoxinas en el desarrollo del cáncer de hígado.

v). **Obesidad:** En muchos países el incremento de la incidencia del cáncer de hígado ha evolucionado paralelamente al aumento de la obesidad. Además se ha estimado que el 90% de los individuos obesos tienen algún tipo de patología hepática [Neuschwander-Tetri BA et al, 2003]. Por otra parte, la obesidad está relacionada con la aparición de resistencia a la insulina y se sabe que puede contribuir enormemente al desarrollo de esteatosis hepática. Por lo tanto, la inflamación asociada a la esteatosis podría provocar daño crónico en el hígado favoreciendo el desarrollo del hepatocarcinoma.

vi). **Diabetes:** Particularmente, la diabetes tipo II ha sido propuesta como un factor de riesgo para el desarrollo del hepatocarcinoma, posiblemente a través del desarrollo de esteatosis hepática no alcohólica. La relación entre la diabetes de tipo II y el hepatocarcinoma ha sido objeto de muchos estudios; los cuales concluyen que los

pacientes diabéticos tipo II tienen el doble de probabilidad de desarrollar hepatocarcinoma que las personas no diabéticas [El-Serag HB et al, 2004].

vii). **Cloruro de vinilo:** La exposición prolongada a este tóxico está asociado con la aparición de angiosarcoma hepático [Neshiwat LF et al, 1992].

viii). **Deficiencia de  $\alpha$ -1-antitripsina:** La  $\alpha$ -1-antitripsina es un inhibidor de serín-proteasas involucradas en el control de la respuesta inflamatoria y de las cascadas del complemento, la coagulación y la fibrinólisis. Su déficit provoca displasia en los hepatocitos y cirrosis [Fairbanks KD et al 2008]. Tal y como se ha indicado con anterioridad, la cirrosis puede provocar cáncer hepático.

ix). **Hemocromatosis hereditaria:** Enfermedad metabólica caracterizada por la acumulación excesiva de hierro en sangre y en tejidos (hígado y corazón). La acumulación de hierro en el hígado produce toxicidad debido a la formación de radicales libres y a la peroxidación lipídica, que ocasionan muerte celular, fibrosis y cirrosis [Kowdley KV, 2004].

x). **Enfermedad de Wilson:** Enfermedad hereditaria en la que hay una alteración en la circulación y excreción del cobre. El exceso de cobre libre puede dañar el hígado, provocar cirrosis y en ocasiones hepatocarcinoma [Wang XW et al, 2002].

xi). **Otros factores de riesgo:** Hay otros factores que pueden estar relacionados con el cáncer de hígado, pero su relación con la enfermedad no es muy clara. Entre otros se encuentran, el tabaco, los anticonceptivos orales, el café y el tipo de dieta [Yu MC et al, 2008].

## I.2 Clasificación anatómica de los tumores hepáticos

Podemos distinguir dos tipos de tumores hepáticos en función de su origen: el tumor primario de hígado (si se origina en el hígado) o la metástasis hepática procedente de un cáncer primario de naturaleza extrahepática. Los tumores primarios de hígado se pueden dividir en malignos (cáncer de hígado) y en benignos, estos últimos son relativamente frecuentes y asintomáticos. Teniendo en cuenta su gravedad, así como el tipo celular afectado, se pueden distinguir las siguientes tipos de tumores primarios de hígado:

i). **Hemangioma hepático:** Es la lesión hepática benigna más común. Se caracteriza por la aparición de una masa de vasos sanguíneos anormales. Presenta riesgo de hemorragia y cuando es sintomático, se trata quirúrgicamente. Se cree que es una anomalía congénita que puede aparecer en cualquier momento de la vida, pero son más comunes entre los 30 y los 50 años. Siendo más frecuente en la mujer y presentando tumores más grandes que en los hombres. Los niños pueden desarrollar un tipo de hemangioma hepático llamado hemangioendotelioma infantil benigno (también denominado hemangiomatosis hepática multinodular). Este tumor benigno ha sido asociado con insuficiencia cardíaca y muerte prematura.

ii). **Adenoma hepático:** Se trata de un tumor hepático benigno originado por la proliferación descontrolada de los hepatocitos. Aparece sobre todo en la mujer y está asociado al uso de anticonceptivos orales. En general, no presenta síntomas, de modo que muchos de los casos no se llegan a detectar. En raras ocasiones, un adenoma se rompe repentinamente y sangra dentro de la cavidad abdominal, requiriendo cirugía urgente. Los adenomas causados por anticonceptivos orales a menudo desaparecen cuando las mujeres dejan de tomarlos. En algunos casos extremadamente raros el adenoma puede hacerse maligno.

iii). **Hiperplasia nodular focal:** Es el tumor hepático benigno más frecuente en la mujer. Se cree que está causado por la activación de células progenitoras indiferenciadas, a consecuencia de un aumento en el flujo arterial [Lepreux S et al, 2003], [Ji Y et al, 2000]. Podría aparecer en respuesta a agentes nocivos que dañan el hígado. Se piensa que podría ser un estadio previo del hepatocarcinoma.

iv). **Quistes hepáticos:** Son lesiones hepáticas benignas generalmente asintomáticas y que no suelen requerir tratamiento. Se clasifican en quistes parasitarios y quistes no parasitarios (congénitos o adquiridos). Los quistes hepáticos congénitos pueden ser únicos ("quistes solitarios"), múltiples, pero en número limitado ("enfermedad multiquística"), o distribuirse difusamente en el parénquima hepático ("poliquistosis hepática"). En los casos sintomáticos, las manifestaciones clínicas se deben al crecimiento de los quistes o a la compresión sobre órganos o estructuras de la vecindad y no suele aparecer hasta la edad adulta, generalmente entre los 40 y 60 años. En la poliquistosis hepática, el número y tamaño de los quistes hepáticos se relaciona con la edad, el sexo femenino y el número de embarazos, lo que sugiere su regulación

por estrógenos.

v). **Hepatocarcinoma o Carcinoma hepatocelular:** El acrónimo que normalmente se utiliza en la literatura y en el lenguaje científico es: *HCC* (del inglés: *HepatoCellular Carcinoma*). También se denomina hepatoma. Es el cáncer primario de hígado más común en adultos, alcanzado el 90% de los casos de tumores hepáticos. Es un tumor que procede del hepatocito, la célula más abundante en el hígado. Es el cáncer primario de hígado más estudiado y documentado aunque ello no ha redundado en una mejora del tratamiento farmacológico curativo.

vi). **Colangiocarcinoma:** Es un tumor maligno primario de hígado poco frecuente que se origina en las células que recubren los conductos biliares del hígado. Ese tipo de tumor puede producir el bloqueo de los conductos biliares. Afecta tanto a hombres como a mujeres, y la mayoría de los pacientes posee más de 65 años. Es difícil de diagnosticar y en la mayoría de los casos se hace cuando la enfermedad está muy avanzada [Sandhu DS et al, 2008]. Tiene mucha tendencia a diseminarse a otros tejidos.

vii). **Hepatoblastoma:** Es el tumor hepático maligno más frecuente en niños, sin embargo se trata de una enfermedad rara (1% de todos los cánceres infantiles en los países occidentales) [Mann JR et al, 1990]. Aparece normalmente en los tres primeros años de vida. Suele presentarse como una masa sólida que compromete el lóbulo derecho del hígado. Predomina en el sexo masculino con una relación 2:1 [Makin E et al, 2010] y su pronóstico depende fundamentalmente del tipo histológico.

El hepatoblastoma es un tumor asociado de un defecto en la organogénesis, pudiéndose diseminar al cerebro, hueso o placenta [Makin E et al, 2010]. Ocasionalmente es congénito, pero en la mayoría de los casos es esporádico [López-Terrada D et al, 2009], estableciéndose una fuerte asociación entre el hepatoblastoma y la extrema prematuridad [Buckley JD et al, 1989]. Presenta principalmente dos condicionantes genéticos asociados: el síndrome de Beckwith-Wiedemann y la poliposis adenomatosa familiar. También se ha asociado a otros síndromes genéticos como el de Li-Fraumeni, la Trisomía 18 y la glucogenosis tipo I [Litten JB et al, 2008].

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten clasificar el tipo de hepatoblastoma. De este modo podemos distinguir: i) tipo epitelial, el más extendido entre los casos de hepatoblastoma y está constituido por células epiteliales hepáticas fetales; si se practica una resección quirúrgica completa de la masa se logra una supervivencia del 100%; ii)

tipo mesenquimatoso, constituido por tejido embrionario; iii) tipo mixto, mezcla de tipo epitelial y de tipo mesenquimatoso; y iv) tipo anaplásico o de célula pequeña, el cual representa un porcentaje de un 5% de los pacientes; es el que tiene peor pronóstico y está constituido por tejido indiferenciado [Correa Báez Y et al, 2003] [Warmann SW et al, 2009].

La mayoría de estos tumores se presentan como una masa abdominal asintomática; el dolor abdominal, la pérdida de peso y la irritabilidad son características de una neoplasia avanzada y se observan en menos del 25% de los casos. El paciente también puede presentar vómitos, diarrea, anemia, ascitis y fiebre; observándose en algunos casos ictericia [Tomlinson GE et al, 2002].

Actualmente sobreviven el 75% de los pacientes y si el hepatoblastoma se encuentra en estadios iniciales hay una supervivencia del 90% [Litten JB et al, 2008].

viii). **Angiosarcoma hepático:** También conocido como sarcoma de Kupffer. Es un tumor poco frecuente, de difícil diagnóstico y su evolución es generalmente rápida y fatal. Aunque se han descrito diferentes agentes etiológicos, en más del 75% de los casos la causa es desconocida. Se trata de una patología difícil de distinguir clínicamente, ya que los datos analíticos y de imagen que le caracterizan no son muy evidentes; debido a esto, se obtienen un gran número de diagnósticos “post-mortem”. No existe un tratamiento médico curativo, únicamente medidas paliativas cuando se alcanzan las fases finales de la enfermedad. El tratamiento más eficaz es quirúrgico, pero es técnicamente muy complejo y en muchas ocasiones la enfermedad está diseminada en el momento del diagnóstico, siendo la resección inútil.

### **I.3 Diagnóstico clínico del cáncer de hígado**

#### **I.3.i Sintomatología**

El hepatocarcinoma es un tipo de cáncer de difícil detección en sus primeras etapas, debido a que es asintomático, siendo difícil su detección ya que está situado en una zona del cuerpo muy protegida, debajo del diafragma y parcialmente cubierto por las costillas. Además se añade la característica de que el hígado es un órgano con gran volumen y por lo tanto una pequeña malignidad pasa inadvertida a la palpación. Otro aspecto que hace al hígado resistente a la detección precoz es la gran funcionalidad que

posee, por lo que seguirá cubriendo las necesidades del organismo hasta que los síntomas de la enfermedad sean evidentes. Por ello, hasta que los tumores no alcanzan un tamaño considerable no empiezan a aparecer los síntomas. Estos síntomas consisten en sensación de pesadez en el lado derecho del tronco y fatiga (debido al elevado metabolismo del tumor), somnolencia, pérdida de apetito y pérdida de peso (debido al aumento del catabolismo proteico), náuseas y vómitos (debido al retraso del vaciamiento gástrico), escalofríos, fiebre (debido a la producción de sepsis y/o colangitis), alteraciones en la coagulación sanguínea y también dolor en el cuadrante superior derecho del abdomen debido a que se produce el estiramiento de la cápsula o envoltura que recubre el hígado. Otro rasgo característico que se produce en fases avanzadas del hepatocarcinoma es el agrandamiento del hígado o hepatomegalia (aumentando los niveles séricos de transaminasas, ácidos grasos y de la enzima lactato deshidrogenasa), y en etapas aún más avanzadas la disminución del ciclo de la urea provoca hiperamonemia. Esta descompensación hepática está asociada con la aparición de ascitis (acumulación de fluidos en el abdomen), debido posiblemente a la disminución de la síntesis de proteínas plasmáticas, como por ejemplo, de albúmina y a la aparición de hipertensión portal. También se observa en esta etapa, ictericia (aumento de los niveles de bilirrubina) y por consiguiente coluria (excreción de bilirrubina por vía urinaria). Cuando este cuadro empeora se pueden producir estados de confusión, temblores y encefalopatía hepática por acumulación de toxinas en la sangre y en el sistema nervioso central, ocasionando daño cerebral [Groen KA et al, 1999], [Lau WY et al, 2000].

### **I.3.ii Métodos de diagnóstico**

El diagnóstico del hepatocarcinoma en sus fases iniciales (hepatocarcinoma temprano), es muy complicado, debido a que en estas fases es asintomático y a que el hígado sigue siendo funcional en estas etapas de la enfermedad. Puede resultar asintomático aun ocupando el tumor el 50% del órgano. La mejor herramienta para poder realizar un diagnóstico precoz es hacer un seguimiento de la enfermedad cuando existan conductas de riesgo que están relacionadas con el hepatocarcinoma.

Las herramientas diagnósticas utilizadas habitualmente son las siguientes [Yoshida H et al, 2005]:

### i). **Diagnóstico por imagen:**

i.i). Ecografía abdominal: es una técnica simple y mínimamente invasiva para el paciente. Sin embargo, la detección de los nódulos del hepatocarcinoma no es muy concluyente y dependerá de la pericia del examinador [Peterson MS et al, 2001]. Por lo tanto, esta técnica no es definitiva para el diagnóstico de la enfermedad y deberá ser completada por otras pruebas de imagen.

i.ii). Tomografía axial computerizada (TAC) de abdomen: es la técnica habitualmente utilizada en el diagnóstico por imagen del hepatocarcinoma. Para mejorar la sensibilidad de esta técnica se utilizan contrastes químicos [Matsuo M et al, 2001]. Es capaz de detectar hasta el 90% de los casos de hepatocarcinoma.

i.iii). Resonancia magnética nuclear: Se caracteriza por ser una técnica no invasiva que se utiliza también para la detección por imagen del cáncer hepático. Muchos trabajos afirman que la resonancia magnética nuclear posee ciertas ventajas con respecto a la tomografía axial computerizada para el diagnóstico del hepatocarcinoma, pero aún existe controversia sobre este tema [Krinsky GA et al, 2001]. Los usos para los cuales está indicada la resonancia magnética nuclear son las siguientes: nódulos que no pueden ser diagnosticados por TAC, pacientes con un nivel elevado de algún marcador tumoral sin detección de nódulos por TAC, pacientes alérgicos a los contrastes químicos usados en el TAC y pacientes con disfunción renal.

i.iv). Angiografía: Es una técnica más invasiva que la ecografía, que el TAC y que la resonancia magnética nuclear, por lo que se utiliza muy poco en el diagnóstico del hepatocarcinoma. Sin embargo, se emplea en el tratamiento de esta enfermedad. Consiste en la introducción de un micro-catéter, a través de la vena cubital o de la arteria femoral, por el que se introduce un contraste que permite visualizar los vasos sanguíneos [Iwazawa J et al, 2009].

### ii). **Marcadores tumorales:**

ii.i). Alfa-fetoproteína (AFP): La proteína denominada alfa-fetoproteína ha sido ampliamente utilizada como marcador tumoral. Es el elemento más abundante del suero fetal. Sus niveles se vuelven casi indetectables después del nacimiento y sólo se elevarán si se producen situaciones patológicas tales como el cáncer de hígado, la regeneración hepática o el cáncer embrionario. También es un marcador muy utilizado



para controlar la posible recurrencia de la enfermedad después del tratamiento. Uno de los problemas que plantea la utilización de este marcador es la poca especificidad para la detección del hepatocarcinoma, dado que también se expresa en procesos cirróticos y en la hepatitis crónica, en ausencia de cáncer de hígado. Para resolver esta cuestión se miden los niveles de una fracción más específica de AFP, AFP-L3. La especificidad de esta fracción de la AFP es de alrededor del 90% [Shiraki K et al, 1995].

ii.ii). Des- $\gamma$ -carboxiprotrombina (DCP): se conoce también como proteína inducida por ausencia de vitamina K o antagonista II (PIVKA II). Es una forma anómala de la protrombina, proteína que forma parte de la cascada de coagulación sanguínea. Se ha estudiado como marcador tumoral del hepatocarcinoma. La especificidad de este marcador está entre el 87 y el 96%, y no se encuentra elevado en otras enfermedades hepáticas [Aoyagi Y et al, 1996], [Liebman HA et al, 1984], [Marrero JA, et al, 2003]. La DCP también se usa en el seguimiento de las recidivas del hepatocarcinoma después del tratamiento. Además, los pacientes que presentan elevados niveles de DCP parecen tener mayor posibilidad de desarrollar metástasis intrahepáticas e invasión de la vena porta por el tumor, lo que se asocia con peor pronóstico de la enfermedad y disminución de la tasa de supervivencia respecto a los pacientes con una DCP negativa.

ii.iii). Glipicano-3 (GPC3): Esta molécula es más sensible que otros marcadores y que las técnicas de imagen. La valoración del fragmento soluble N-terminal del GPC3 se utiliza mucho como marcador serológico del hepatocarcinoma [Hippo Y et al, 2004]. Para el diagnóstico del cáncer de hígado posee una sensibilidad del 85 al 95% [Llovet JM, 2009].

ii.iv). Antígeno carcinoembrionario (CEA): es una glicoproteína implicada en la adhesión celular. Se produce normalmente durante la etapa embrionaria y deja de producirse después del nacimiento, y como la alfa-fetoproteína se verá incrementada en el carcinoma. No es específica del cáncer hepático puesto que sus niveles también están elevados en otros cánceres. CEA puede interactuar y cooperar con oncogenes como ras, v-myc y bcl-2. Por otro lado, se ha observado que las células tumorales que expresan esta proteína también sobre-expresan genes de resistencia a fármacos (mdr1) y de respuesta al estrés oxidativo (GST- $\pi$ ). Está relacionada con la diseminación metastásica de las células de cáncer de colon.



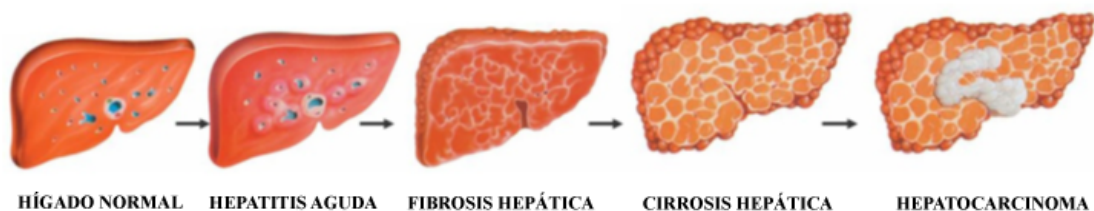
ii.v). Albúmina: Es la proteína globular más abundante en la sangre. Es una proteína que ayuda a los hepatólogos a situar la fase del hepatocarcinoma y a seguir el tratamiento del mismo. Según avanza la enfermedad los niveles de albúmina disminuyen.

ii.vi). Bilirrubina: Al contrario de lo que sucedía con la albúmina, el aumento de bilirrubina indica daño hepático. Se usará también para establecer la fase de la enfermedad y monitorizar el tratamiento del cáncer.

ii.vii). Otros marcadores: Otras moléculas que se suelen valorar como marcadores del hepatocarcinoma son las transaminasas (ALT y AST), la fosfatasa alcalina y la gamma-glutamiltanspeptidasa ( $\gamma$ -GT). Además de los ya mencionados, se están estudiando los anticuerpos contra p53, cuyos niveles en suero se han visto elevados en el hepatocarcinoma, pero también en otros cánceres gastrointestinales. La enzima glicilprolina dipeptidil aminopeptidasa (GPDA), puede ser de gran interés en aquellos pacientes en los que no se ve alterada la AFP, ya que parece estar elevada en pacientes con hepatocarcinoma. Podría ser interesante estudiar el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que parece estar asociado con la capacidad de metástasis del HCC, siendo de gran valor predictivo en el comportamiento de la enfermedad.

### I.3.iii Clasificación clínica del hepatocarcinoma

El cáncer de hígado se desarrolla a lo largo de varias etapas: hígado normal o sano, infección o hepatitis, fibrosis hepática, cirrosis hepática y en último lugar, el hepatocarcinoma.



**Fig.3: Fases hasta la formación del hepatocarcinoma. (Modificado de Greten TF, 2010)**

Los diferentes autores, a lo largo de los últimos años, han establecido distintas clasificaciones para discriminar la fase clínica en la que se encuentra el paciente. Estas clasificaciones son importantes porque permiten al médico estratificar a los pacientes en grupos con distinto pronóstico para designar el mejor tratamiento para cada uno. También es de utilidad a la hora de comparar la eficacia del tratamiento y para aleatorizar a los pacientes en los ensayos clínicos, así como para intercambiar información entre médicos e investigadores. Estas clasificaciones están basadas en la identificación de diferentes variables individuales que están relacionadas con la supervivencia de un paciente con cáncer de hígado.

En el momento actual, no hay consenso a nivel mundial sobre el sistema de clasificación del hepatocarcinoma, posiblemente porque el modelo utilizado tiene en consideración numerosas variables [Bolondi L et al, 2009]. En otros tipos de tumores sólidos, el pronóstico está relacionado principalmente con el grado del tumor y su estadio; en el hepatocarcinoma además hay que tener en cuenta la funcionalidad hepática. En el 80% de los casos, el cáncer de hígado primario se desarrolla a partir de una cirrosis, siendo necesario tener en cuenta tanto el estadio del tumor y la función hepática para elegir el tratamiento más conveniente. La asociación europea para el estudio del hígado (EASL) recomienda tener en cuenta cuatro puntos cruciales: el estadio del tumor, el grado de funcionalidad hepática, la aplicabilidad y eficacia del tratamiento y el estado general del paciente [Bruix J et al, 2001].

Hay siete clasificaciones diferentes al respecto (Okuda, TNM, CLIP, BCLC, CUPI, JIS, GRETCH). Sólo se explicarán las más utilizadas a nivel mundial [Marrero JA et al, 2005]:

**i). El sistema Okuda:** Es un sistema de clasificación muy utilizado en la última década [Okuda K et al, 1985]. Aunque fue desarrollado hace más de 25 años, cuando el diagnóstico de hepatocarcinoma se hacía en fases avanzadas (fases sintomáticas) y la detección temprana era rara, como consecuencia, no es un sistema adecuado para la estratificación de los pacientes en fases tempranas e intermedias de la enfermedad. Incluye variables relacionadas con la función hepática, como son la albúmina, la bilirrubina y la ascitis, así como la extensión del tumor (tiene en cuenta si es más o es menos del 50% del hígado). Una de sus principales limitaciones es que no discrimina entre los pacientes que tienen un nódulo o varios y además omite marcadores

tan importantes como la alfa-fetoproteína.

PARÁMETRO OKUDA	0 PUNTOS	1 PUNTO
Tamaño del tumor	<50% del hígado	>50% del hígado
Ascitis	No	Sí
Albumina (g/dL)	$\geq 3$	<3
Bilirrubina (mg/dL)	<3	$\geq 3$

**Fig.4: Esquema del sistema Okuda para la clasificación del hepatocarcinoma. (Modificado de Bolondi L et al, 2009)**

De este sistema de puntos se obtiene la clasificación Okuda para el hepatocarcinoma: **Estadio Okuda I** (0 puntos), **Estadio Okuda II** (1 ó 2 puntos), **Estadio Okuda III** (3 ó 4 puntos).

ii). **El sistema del programa italiano de cáncer de hígado (CLIP):** Esta clasificación fue propuesta en Italia en 1998 [[The Cancer of the Liver Italian Program \(CLIP\) investigators, 1998](#)]. La clasificación CLIP fue desarrollada a partir de un estudio retrospectivo de 435 pacientes con hepatocarcinoma, diagnosticados de 1990 a 1992, que incluye cinco variables independientes: el estadio Child-Pugh, la morfología del tumor, la extensión del tumor, la presencia de trombosis en la vena porta y los niveles de alfa-fetoproteína en suero. Aunque este sistema de estratificación presenta mejoras con respecto al Okuda [[The Cancer of the Liver Italian Program \(CLIP\) investigators, 2000](#)], también falla a la hora de diagnosticar tumores en fase temprana, dado que a un tumor de hasta un 50% de tamaño del hígado lo sitúa en el primer estadio de su clasificación (CLIP 0) [[Marrero JA et al, 2005](#)].

El sistema CLIP tiene en cuenta cinco variables y una de ellas es el estadio Child-Pugh. El estadio Child-Pugh es una medida de la funcionalidad hepática del paciente que incluye los siguientes parámetros: bilirrubina, albúmina, tiempo de protrombina, ascitis y encefalopatía hepática.

PARÁMETRO CHILD-PUGH	1 PUNTO	2 PUNTOS	3 PUNTOS
Bilirrubina (mg/dL)	<2	2-3	>3
Albúmina (g/dL)	>3.5	2.8-3.5	<2.8
Tiempo de protrombina (INR)	<1.7	1.7-2.2	>2.2
Ascitis	No	Moderada	Severa
Encefalopatía hepática	No	Grado I-II	Grado III-IV

**Fig.5: Esquema de determinación del estadio Child-Pugh. (Modificado de Bolondi L et al, 2009)**

El sistema de Child-Pugh tiene tres grupos: **A** (si se alcanzan 5 ó 6 puntos); **B** (si se alcanzan de 7 a 9 puntos); **C** (si se alcanzan de 10 a 15 puntos).

Una vez que tenemos en cuenta esta variable más las otras cuatro podemos determinar la clasificación CLIP:

De este sistema de puntos se obtiene la clasificación CLIP para el hepatocarcinoma: **Estadio CLIP 0** (0 puntos), **Estadio CLIP I** (1 a 3 puntos), **Estadio CLIP II** (4 a 6 puntos).

PARÁMETRO CLIP	0 PUNTOS	1 PUNTO	2 PUNTOS
Child-Pugh	A	B	C
Morfología del tumor	Mononodular <50% de hígado	Multinodular ≤50% del hígado	Masivo >50% del hígado
AFP (ng/mL)	<400	≥400	≥400
Trombosis de la vena porta	No	Sí	Sí

**Fig.6: Esquema para la determinación de la clasificación del sistema CLIP para estratificar los pacientes con hepatocarcinoma. (Modificado de Bolondi L et al, 2009)**

iii). **Sistema de estratificación del Hospital Clínico de Barcelona (BCLC: Barcelona Clinic Liver Cancer):** El sistema BCLC se desarrolló en base a un análisis retrospectivo de diferentes estudios de cohortes de pacientes de hepatocarcinoma con enfermedad temprana, intermedia y avanzada [Llovet JM et al, 1999]. Los investigadores observaron al hacer este análisis que los pacientes con la

enfermedad en el estadio temprano poseían también hipertensión portal y niveles algo elevados de bilirrubina (>1.5mg/dL). Para los pacientes con la enfermedad en estado intermedio observaron que la supervivencia de los mismos estaba afectada significativamente por extensos tumores multinodulares. Para los pacientes terminales, o en estado avanzado, observaron el deterioro del estado físico y la presencia de invasión vascular.

Por lo tanto, el sistema BCLC incluye variables relacionadas con el estadio del tumor, con la función hepática, con el estado físico y con los síntomas relacionados con el cáncer.

FASE DEL TUMOR				
Estadio BCLC	Estado físico	Estadio del tumor	Estadio Okuda	Función hepática
<b>Hepatocarcinoma temprano (A)</b>				
A1	0	mononodular, <5cm	I	Sin HTP, BL normal
A2	0	mononodular, <5cm	I	HTP, BL normal
A3	0	mononodular, <5cm	I	HTP, BL anormal
A4	0	3 nódulos, <3cm	I-II	Child-Pugh A-B
<b>Hepatocarcinoma intermedio (B)</b>	0	multinodular extenso	I-II	Child-Pugh A-B
<b>Hepatocarcinoma avanzado (C)</b>	1-2	invasión vascular y diseminación extrahepática	I-II	Child-Pugh A-B
<b>Hepatocarcinoma terminal (D)</b>	3-4	cualquiera	III	Child-Pugh C

**Fig.7: Clasificación BCLC para estratificar a los pacientes con hepatocarcinoma. HTP: Hipertensión portal; BL: Bilirrubina (Modificado de Bolondi L et al, 2009)**

A día de hoy este sistema es el más utilizado a nivel mundial y está aprobado por la EASL (European Association for the Study of the Liver) y por la AASLD (American Association for the Study of Liver Diseases) [Bruix J et al, 2005], [Bruix J et al, 2001]. Las principales ventajas que tiene el BCLC están relacionadas con que se consideran los diferentes factores que pronostican el estadio del tumor y permiten estimar mejor la esperanza de vida del enfermo. De hecho, este sistema de estratificación identifica

claramente a los pacientes de hepatocarcinoma temprano, que se podrían beneficiar de tratamientos curativos, a los pacientes de estadio intermedio o avanzado, que recibirían tratamientos paliativos, y a los pacientes terminales o de estadio final con una baja esperanza de vida.

El estado físico se establece según la clasificación de la *Organización Mundial de la Salud*:

ESTADO FÍSICO	
<b>Estado 0</b>	Actividad plena, vida normal, sin síntomas
<b>Estado 1</b>	Pocos síntomas, capaz de tener actividad ligera
<b>Estado 2</b>	Capaz de cuidarse a sí mismo. Capaz de trabajar al 50% de actividad
<b>Estado 3</b>	Limitado para cuidarse a sí mismo. Confinado en cama y silla al 50%
<b>Estado 4</b>	Totalmente dependiente. En cama o silla

**Fig.8: Clasificación del estado físico, proporcionado por la Organización Mundial de la Salud (Modificado de Bolondi L et al, 2009).**

#### **I.4 Procesos celulares implicados en la aparición del tumor**

El mantenimiento del tamaño y del peso de un órgano depende del número de células, así como del tamaño de las mismas. El número de células depende de dos procesos antagónicos, como son la división y la muerte celular. Durante la generación de un tumor se produce un proceso de hiperplasia que puede deberse a la aceleración del ciclo celular, al activarse determinados oncogenes, como por ejemplo CTNNB1, AXIN1, PIK3CA o KRAS2, o también en la inhibición de supresores de tumores, como por ejemplo PTEN, TP53, RB1, CDKN2A o IGF2R [Van Malenstein H, 2011]. Esto último hace que las células tumorales se hagan resistentes al proceso natural de apoptosis o muerte celular programada.

En el primer caso, la aceleración del ciclo celular da lugar a una hiperplasia por generación de células hijas, mientras que en el segundo tipo la hiperplasia se debe al aumento de células viejas que no desaparecen. El cambio adaptativo del tumor hacia formas más agresivas o metastásicas va a depender de otros muchos factores, como por

ejemplo de la capacidad de la célula tumoral para:

- a). Movilizar sus propios recursos energéticos mediante el proceso de autofagia.
- b). Activar su metabolismo anaerobio.
- c). Generar la formación de vasos sanguíneos (proceso de angiogénesis).
- d). Perder adhesión celular con las células vecinas y migrar al torrente vascular.
- e). Escapar del torrente vascular y adherirse a células de otros tejidos.
- f). Proliferar en nuevas localizaciones.

De todos los procesos anteriores sólo se abordarán aquellos que tienen relación con el trabajo experimental realizado. Dichos procesos serán, la división celular, la muerte celular, la autofagia y la senescencia. Además se hará hincapié en la importancia que tiene el estrés oxidativo en estos procesos celulares.

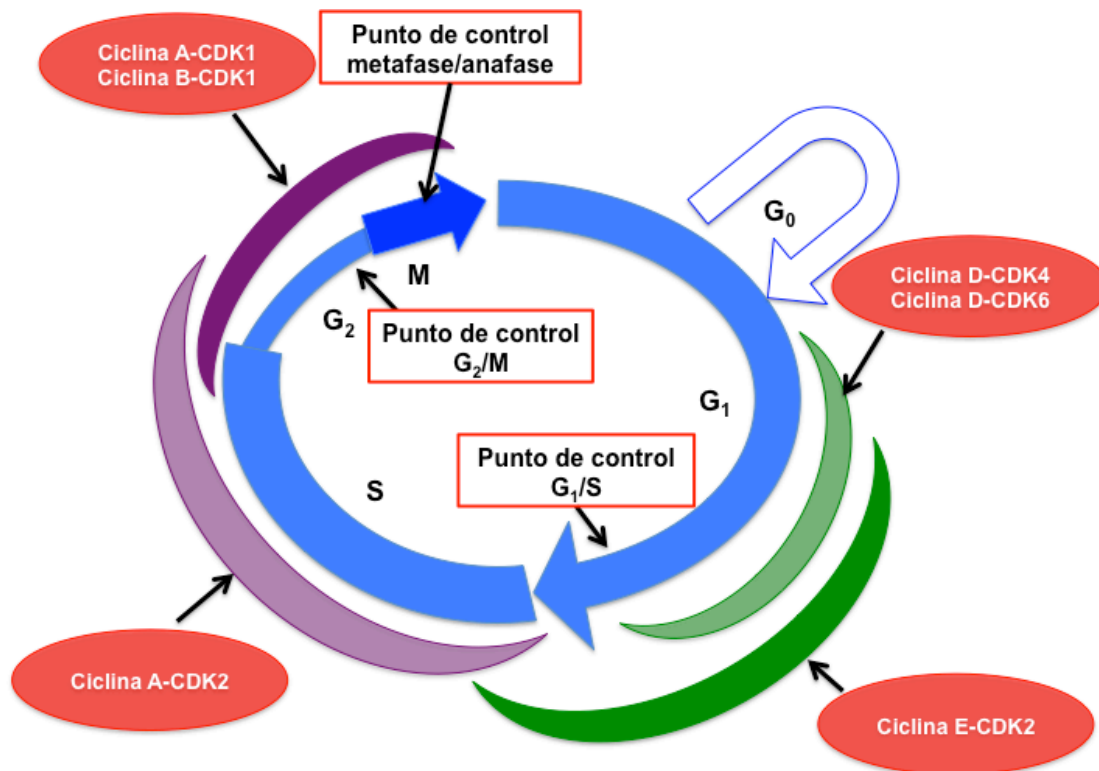
### **I.4.i División celular**

El proceso biológico más importante por el que la célula mantiene su supervivencia es la división celular. Dicho proceso se produce al final del ciclo celular, el cual es un conjunto ordenado de sucesos que conducen a la obtención de dos células hijas a partir de una célula parental. Cuando este proceso tiene lugar en numerosas células de forma simultánea se habla de un estado proliferativo, que es más activo durante la embriogénesis y el desarrollo de un organismo, y también es fundamental para la regeneración de tejidos dañados o viejos.

El control de la proliferación celular es esencial para el correcto funcionamiento del organismo. La pérdida de la capacidad proliferativa es uno de los factores responsable del envejecimiento. En sentido contrario, cuando se pierde el control sobre la proliferación celular se producen enfermedades como el cáncer, donde una célula forma una línea celular con capacidad de proliferación ilimitada e incontrolada debido a mutaciones genéticas [Sherr CJ, 1996]. Es por ello que muchas terapias que se utilizan contra el cáncer se dirigen hacia las dianas moleculares que desencadenan esa proliferación descontrolada. Además muchas de estas células generan factores autocrinos y paracrinos que favorecen la proliferación de la propia célula o de las células vecinas. El ciclo celular tiene distinta duración dependiendo del tipo de célula de que se trate; por ejemplo, el de las células de la médula ósea es de unas 18 horas,

mientras que el de las células de las criptas del colon es de 450 horas. Sin embargo, la duración del ciclo celular de células humanas en cultivo es de 24 horas aproximadamente.

El ciclo celular consta de cuatro fases: G<sub>1</sub> (“GAP 1”, intervalo 1), S (“Synthesis”, síntesis del ADN), G<sub>2</sub> (“GAP 2”, intervalo 2) y M (Mitosis) (Figura 9).



**Fig.9: Mecanismo del ciclo celular. (Modificado de Lodish et al, 2005)**

Está fuertemente regulado por diferentes proteínas que actúan en distintos puntos del ciclo.

Durante la mitosis (M) se produce la segregación de las cromátidas hermanas y la división del núcleo en dos mitades aproximadamente iguales: ocurre de manera secuencial, de modo que en la *profase* el material genético se condensa en cromosomas visibles y se forma el huso mitótico a partir de los microtúbulos; durante la *metafase* los cromosomas se alinean en el huso mitótico y comienzan a separarse las cromátidas hermanas durante la *anafase*. En la *telofase* las cromátidas hermanas empiezan a descondensarse y comienzan a separarse los núcleos. Durante la *citocinesis* se separan los citoplasmas de las células formadas y con ello termina la mitosis después de



aproximadamente una hora. Si las células poseen las proteínas suficientes para realizar otra ronda de división empezará un nuevo ciclo, si no se mantendrán en fase G<sub>0</sub> hasta que se sinteticen las proteínas necesarias para iniciar un nuevo ciclo celular [Leake R, 1996]. Ello dependerá de que se activen los puntos de control a lo largo del ciclo celular, que se encuentran en las interfases G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M y en la metafase/anafase. Dichos puntos se activan por la formación de complejos proteicos entre las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDK). Dichos complejos heterodiméricos tienen

FASE DEL CICLO	TIPO DE CICLINA	TIPO DE CDK	PROCESO BIOLÓGICO
G <sub>1</sub>	Ciclina D	CDK4 o CDK6	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Formación de complejos de prerreplicación del ADN en el origen.</li> <li>2. Expresión de las enzimas necesarias para la síntesis del ADN.</li> <li>3. Inducción de la síntesis de ciclina E, de ciclina A y de CDK2</li> </ol>
G <sub>1</sub> /S	Ciclina E	CDK2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inducción de la degradación de los inhibidores CDK de la fase S.</li> </ol>
S	Ciclina A	CDK2	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Fosforilación de las proteínas que forman los complejos de prerreplicación.</li> <li>2. Inhibición de la aparición de nuevos complejos de prerreplicación.</li> </ol>
M	Ciclinas A y B	CDK1	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Activación de la condensación cromosómica.</li> <li>2. Desintegración de la envoltura nuclear y formación del huso mitótico.</li> <li>3. Activación del complejo promotor de la anafase.</li> <li>4. Degradación de la ciclina B.</li> </ol>

**Fig.10: Diferentes ciclinas y CDKs que existen en mamíferos, con los procesos biológicos que estimulan en las distintas fases del ciclo celular.**

actividad Serina/Treonina quinasa, donde la CDK es la subunidad catalítica y la ciclina es la subunidad reguladora. En la tabla representada en la figura 10 se describen las ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas, que van a participar en cada una de las

fases del ciclo celular de los mamíferos, junto con el proceso biológico que se va a producir por la activación de éstas.

El primer punto de control ( $G_1/S$ ) está regulado por la ciclina D que se une a CDK4 ó CDK6. El segundo punto de control ( $G_2/M$ ) estará regulado por la ciclina B que se unirá a la CDK1. El tercer punto de control entre la metafase y la anafase, determina si se segregan, o no, las cromátidas hermanas.

El mecanismo de regulación estará dirigido, además de por los complejos ciclina-CDK, por diferentes proteínas:

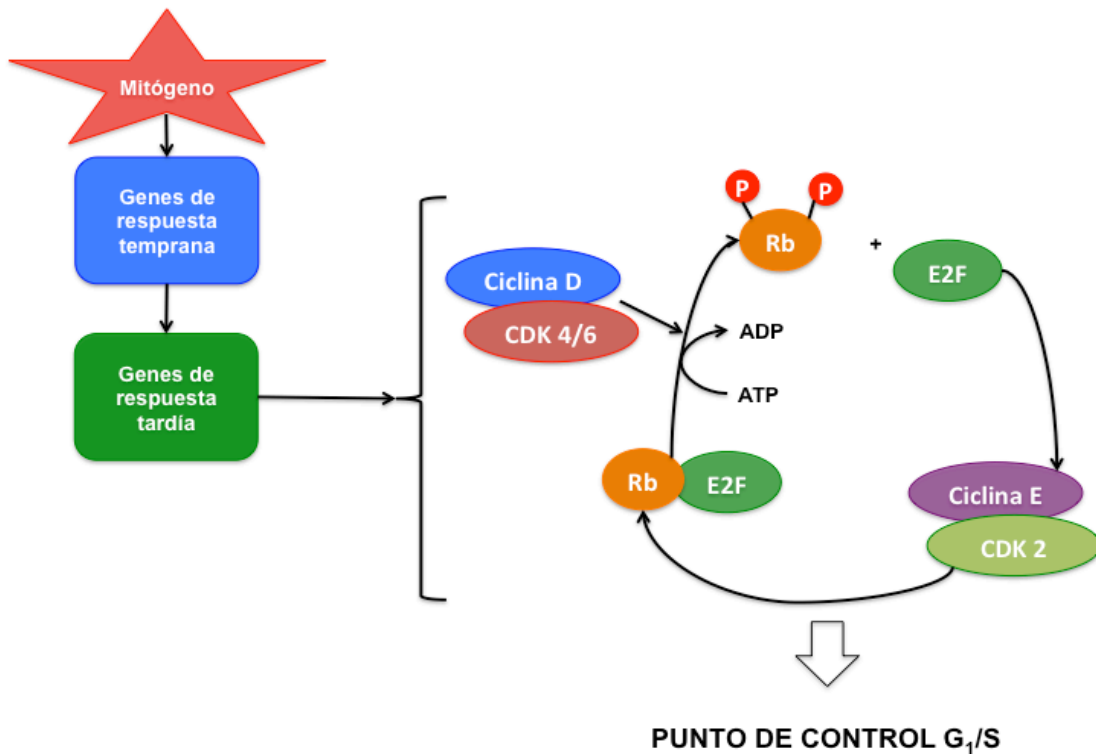
a). Proteínas que inhiben las CDKs (actúan en la fase  $G_1$ ): Son conocidas como las proteínas CKI (quinasas inhibitoras de ciclina).

- p16: Se asocia a la CDK4/6 e inhibe su actividad en la fase  $G_1$ .
- p27: Inhibe la actividad de la CDK2. Ayuda a la salida del ciclo (hacia  $G_0$ ).
- p21: Si hay un daño en el ADN, en la fase  $G_1$ , inhibe la actividad de la CDK2, parando así el ciclo en este punto de control. Cuando está sobreexpresada la proteína p53 por algún daño celular, se activa la p21 para detener la proliferación de la célula y promoverla hacia un proceso de muerte por apoptosis. La proteína p53 está mutada en un alto porcentaje de los tumores y líneas celulares de cáncer, lo cual previene, por lo tanto, a las células de la apoptosis y activa su proliferación.

b). Proteínas que regulan los factores de transcripción: un factor de transcripción es una proteína que se une a secuencias específicas del ADN y que controla, activando o bloqueando, la transcripción de genes.

- E2F: Activa la transcripción de los genes que codifican para las proteínas que forman el complejo ciclina E-CDK2, que permiten la progresión desde la fase  $G_1$  a la fase S y que codifican para las proteínas requeridas para la síntesis del ADN en respuesta a factores mitogénicos extracelulares.
- p53: Activa la transcripción de los genes que producen la parada del ciclo celular, por ejemplo p21. Se activa por estrés celular entre otros factores.

Normalmente, la proteína supresora de tumores Rb (proteína del retinoblastoma) no se encuentra fosforilada y está unida al factor de transcripción E2F, bloqueando el ciclo celular. Cuando las células entran en esta fase del ciclo celular, el complejo ciclina



**Fig.11: Diagrama de la regulación por mitógenos del punto de control G<sub>1</sub>/S. (Adaptado de Lodish H et al, 2005)**

D-CDK4 ó 6 fosforila Rb dando lugar a la liberación de E2F que es capaz de activar la transcripción de genes que codifican para la ciclina E, CDK2 y otras proteínas necesarias en la fase de síntesis (S). Una vez sintetizadas la ciclina E y la CDK2 se forma el complejo ciclina E-CDK2 que fosforila aún más a Rb, con lo que E2F se activa al máximo, dando lugar a un bucle de retroalimentación positiva, lo que conduce a la sobreexpresión de este factor de transcripción (figura 11). La activación de E2F es clave en el paso a través del punto de control G<sub>1</sub>/S ya que activa al siguiente complejo ciclina A-CDK2, implicado en el ciclo celular. En condiciones normales, este complejo se encuentra reprimido por la acción de las proteínas inhibidoras de CDKs, conocidas como CKIs (p21, p27 y p57). La acción de la fosfatasa Cdc25A produce la liberación de la CDK2 y favorece la degradación de las CKIs en el proteosoma, lo que da lugar al paso a la fase S del ciclo celular. La liberación del complejo ciclina A-CDK2 produce la activación del mismo y esta activación, a su vez, provoca la activación de los complejos de pre-replicación de la fase S, al fosforilar los componentes de los mismos. Esto produce el desenrollamiento de la doble hebra del ADN y el inicio de la replicación.

Una vez completada la síntesis del ADN, se producirá la entrada en la fase  $G_2$ . En esta fase  $G_2$  se produce un aumento de la síntesis de la ciclina B, la formación del complejo ciclina B-CDK1 y la activación del mismo. En esta fase comienza la condensación de los cromosomas y el complejo ciclina B-CDK1 inducirá la formación del huso mitótico por la fosforilación de las proteínas implicadas en la formación del mismo. Una vez formado el huso mitótico se alcanza la metafase, donde las cromátidas hermanas estarán unidas entre sí por las cohesinas. En este punto, el complejo ciclina B-CDK1 fosforila el complejo promotor de la anafase ( $APC^{Cdc20}$ ) y lo activa. Esta activación induce la ubiquitinación y degradación proteosomal de la proteína securina, permitiendo la liberación de la proteína separasa que permanecía secuestrada por la unión previa con securina. La proteína separasa, libre y activa, se encarga de romper las cohesinas y por consiguiente separar las cromátidas hermanas y promover la anafase. Después de esto se producirá una degradación significativa de la ciclina B vía ubiquitinación y degradación proteosomal y por lo tanto, la inactivación de ciclina B-CDK1; por otro lado, el complejo proteico  $APC^{Cdh1}$  inactivará al complejo  $APC^{Cdc20}$  produciendo así la entrada en la telofase y posteriormente en la citocinesis [Lodish H et al, 2005].

Normalmente, las células de mamífero en ausencia de hormonas y mitógenos están en fase  $G_0$ . Es necesaria la presencia de factores de crecimiento o mitógenos para que se ponga en marcha la maquinaria enzimática necesaria para la activación del ciclo celular.

Para desencadenar la proliferación hace falta que se active el ciclo celular. Esto ocurre porque los factores de crecimiento activan las diferentes cascadas de señalización, como por ejemplo MAPKs, PI3K/AKT/m-TOR (apartado I.5 de la introducción), las cuales activarán factores de transcripción que inducirán la expresión de genes necesarios en el control del ciclo celular, por ejemplo myc, fos, jun (genes de respuesta temprana) y ciclinas y CDKs (genes de respuesta tardía).

Por lo tanto, para que se active la proliferación en una célula, ésta debe pasar de un estado quiescente (fase o estado  $G_0$ ) al estado  $G_1$  del ciclo de división celular. Un estímulo del paso de  $G_0$  a  $G_1$  es el IGF-1. Cuando este factor de crecimiento llega a la célula y se une a su receptor de membrana IGF-1R se produce una cascada de señalización en la cual se irán activando, por fosforilación, diversas proteínas de la ruta de señalización de las quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Esto va a producir la

activación secuencial de los genes de respuesta temprana y, posteriormente, de la transcripción de genes de respuesta tardía. La activación de los genes de respuesta temprana se induce a los pocos minutos de la llegada del factor de crecimiento y entre ellos se encuentran algunos factores de transcripción como por ejemplo, c-fos, c-jun o c-myc, los cuales a su vez estimularán la transcripción de genes de respuesta tardía. Después de 30 minutos, los niveles de ARN mensajero de los genes de respuesta temprana descienden a un nivel menor y se producirá consecuentemente la transcripción de los genes de respuesta tardía, como por ejemplo los correspondientes a la ciclina D, la ciclina E y las quinasas dependientes de ciclina (CDK4, CDK6, CDK2) y el factor de transcripción E2F [Hematulin A et al, 2008], [Lodish H et al, 2005].

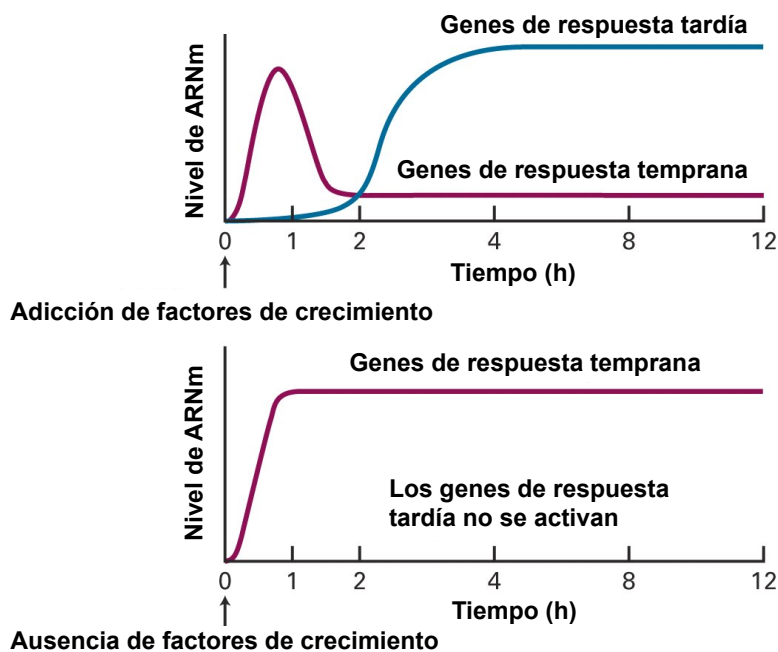


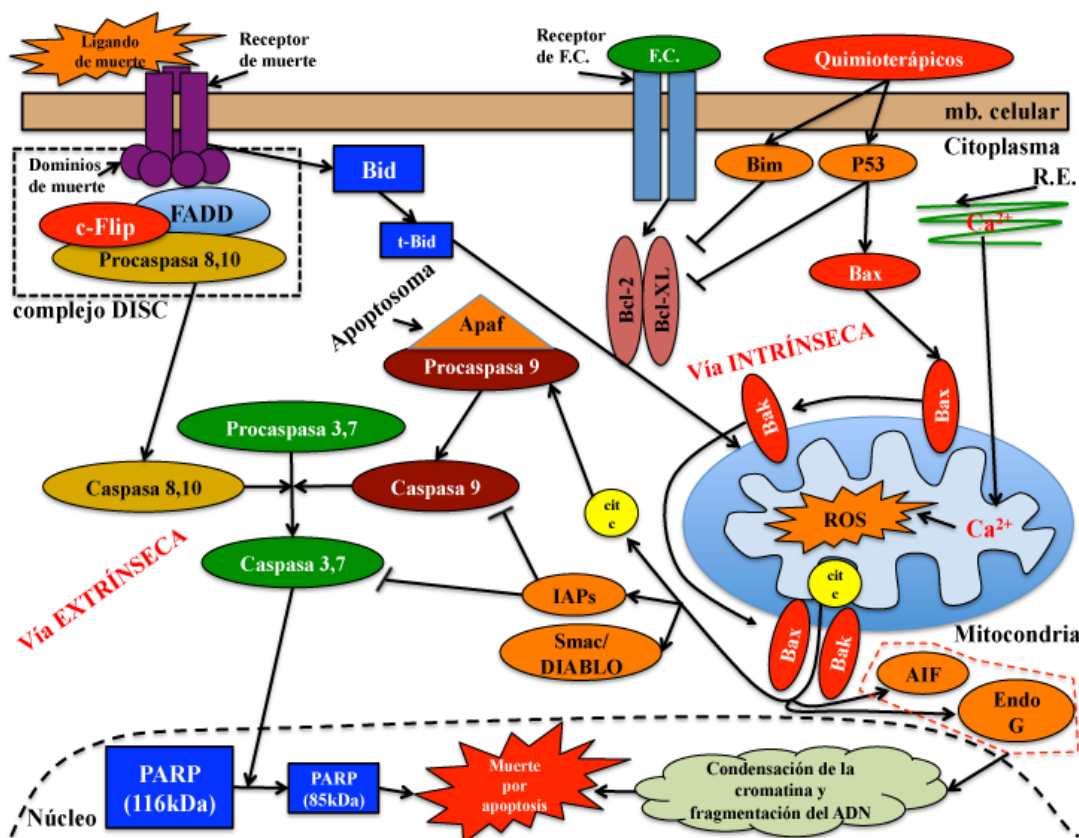
Fig.12: Esquema de la activación de los genes de respuesta temprana o tardía en ausencia o presencia de factores de crecimiento. (Adaptado de Lodish H et al, 2005)

#### I.4.ii Muerte celular

La muerte celular es un proceso destructivo que ocurre cuando se somete a la

célula a agresiones que comprometen la viabilidad de la misma. Para que el organismo se encuentre en buen estado debe haber un equilibrio entre los procesos de muerte y de división celular. Cuando hay una desregulación en este balance, se desencadenan procesos patológicos como el cáncer. Hay diferentes tipos de muerte celular:

**i). Muerte celular por apoptosis:** La apoptosis es conocida como la muerte celular programada. Es de vital importancia en el desarrollo y el mantenimiento de los organismos pluricelulares; un ejemplo muy gráfico es la desaparición de la cola de los renacuajos cuando se produce la metamorfosis para convertirse en ranas. El científico alemán Carl Vogh fue el primero en describir el fenómeno de la apoptosis en 1842; sin embargo, hasta 1965 gracias a los estudios del científico australiano John Foxtton Ross Kerr no se volvió a investigar con profundidad en dicho proceso celular. La apoptosis está caracterizada por una serie de alteraciones morfológicas que aparecen en las células y, más específicamente, en el núcleo. Las características más llamativas de este tipo de



**Fig.13:** Esquema modelo de las vías de señalización de la apoptosis. *F.C.* (factores de crecimiento). (Adaptado de [Fabregat I et al, 2007] [Klener P Jr et al, 2006])

muerte celular son contracción celular, pérdida de las uniones célula-célula, alteraciones en la membrana citoplasmática y condensación de la cromatina. Además, el ADN nuclear de las células apoptóticas aparece a menudo fragmentado en unidades que corresponden a la longitud del ADN internucleosomal. Otra característica importante de la apoptosis es la ausencia de inflamación, ya que se mantiene la integridad de la membrana que rodea a los fragmentos subcelulares y no se libera al exterior el contenido intracelular potencialmente tóxico, como sucede en la muerte por necrosis.

La apoptosis se puede producir por dos vías de señalización diferentes: la vía extrínseca y la vía intrínseca. En ambas vías se produce la activación de las caspasas. Las caspasas son enzimas con actividad proteolítica de la familia de las cisteinil-aspartato proteasas que se sintetizan como zimógenos, almacenándose como procaspasas, sin actividad proteolítica. Cuando se fragmentan dan lugar a la forma activa.

**La vía extrínseca** de la apoptosis está mediada por receptores de membrana celular conocidos como “receptores de muerte”. A dichas proteínas membranosas pertenece la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R), que está formada por receptores como TNF-R, Fas (APO-1/CD95), TRAMP o receptor de muerte-3 (DR-3), y por receptores para TRAIL (DR-4 y DR-5), CD40, LT- $\beta$ , CD27, CD30, 4-1BBL, FASL y OX40, entre otros [Askenazi, 2002]. La muerte celular se induce por la unión de ligandos como TNF- $\alpha$ , FasL (CD95L) y TRAIL a sus receptores; como consecuencia se produce la activación de sus dominios intracelulares, dando lugar a la formación del complejo inductor de la muerte celular (DISC) que reclutará a las caspasas iniciadoras (caspasas 8 y 10) las cuales activarán a las caspasas efectoras (caspasas 3 y 7). La activación de las caspasas 3 y 7 producirá la ruptura de muchas proteínas celulares y, por lo tanto, alteraciones morfológicas y cambios en el metabolismo que culminan con la muerte de la célula por apoptosis.

**La vía intrínseca** de la apoptosis se activa por la generación de señales intracelulares que se producen como consecuencia de un daño en el ADN, en la mitocondria o en el retículo endoplásmico. Dichas alteraciones celulares se pueden deber a la falta de oxígeno (hipoxia), a la privación de factores de crecimiento, a la disminución de las señales de supervivencia, a infecciones virales, a la activación de proto-oncogenes [Ricci MS et al, 2006], a la activación de los genes supresores de



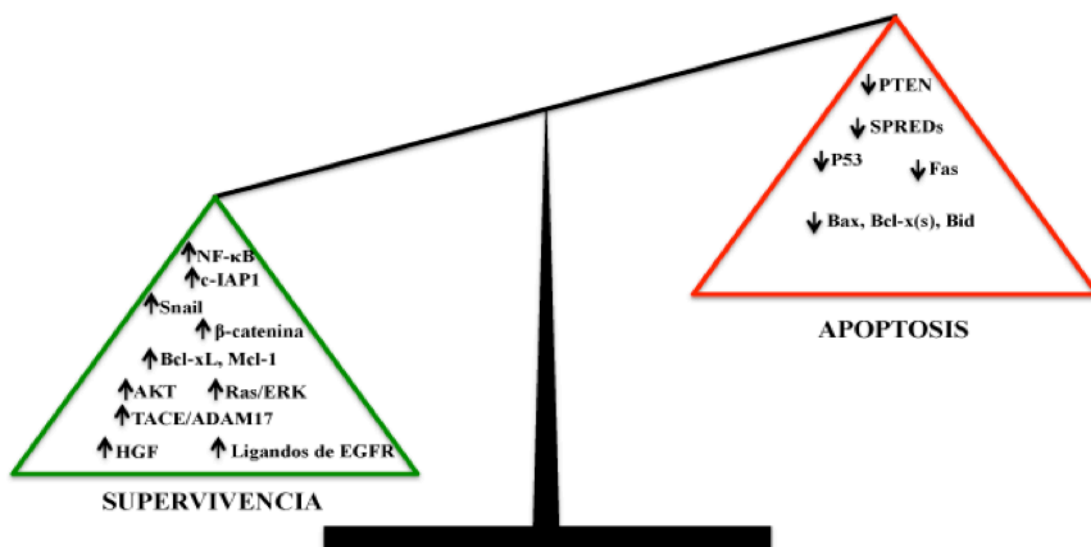
tumores: p53 y PTEN [Klener P Jr et al, 2006], a la exposición a xenobióticos y a radiaciones ionizantes. Cuando la célula se ve sometida a alguna de estas situaciones se produce la activación de la señalización intrínseca de la muerte por apoptosis. En esta vía de señalización participan las proteínas de la familia de Bcl-2, que se dividen en proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, A1/Bfl-1, Mcl-1 y Boo/Diva) y proteínas proapoptóticas (Bax, Bcl-xs, Bak, Bok/Mtd, Bad, Bik/Nbk, Bid, Hrk/DP5, Bim/Bod y Blk). Si se produce una sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas aumentará la supervivencia celular, mientras que cuando se incrementen las proteínas proapoptóticas por algún daño celular, se iniciará la apoptosis. Una de las vías mejor descritas es aquella por la cual, como consecuencia del daño celular, se produce la oligomerización de las proteínas proapoptóticas (Bad o Bax) en la membrana externa de la mitocondria donde se formarán poros provocando la permeabilización y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ). Los daños que se producen en la mitocondria estimulan la liberación de calcio ( $Ca^{2+}$ ) situado en este compartimento, lo que disparará la actividad de enzimas  $Ca^{2+}$ -dependientes, entre ellas numerosas proteasas. Paralelamente se produce una alteración de la cadena de transporte electrónico mitocondrial, lo que da lugar a la aparición de especies reactivas de oxígeno, así como la liberación de alguno de sus componentes como el citocromo c. Otras proteínas mitocondriales liberadas durante este proceso son Smac/DIABLO, AIF (factor inductor de apoptosis) y la endonucleasa G, la cual se encuentra secuestrada en el espacio intermembrana de la mitocondria. Su liberación al citosol y su posterior translocación al núcleo explicarían, en parte, la aparición de fragmentación internucleosomal.

Por otro lado, la liberación de citocromo c desde la mitocondria produce la formación del apoptosoma con las proteínas Apaf-1 y procaspasa-9 en presencia de ATP, lo que conduce a la activación de la caspasa-9 que posteriormente fragmentará la procaspasa-3 dando lugar a la enzima activa, efectora final de la apoptosis. Las caspasas -3 y -7, pueden fragmentar e inactivar a la enzima reparadora del ADN, PARP [Klener P Jr et al, 2006]. Las proteínas liberadas por la mitocondria, AIF y endonucleasa G, actúan como efectores de muerte independientes de caspasas. AIF induce la condensación de la cromatina y la rotura del ADN en fragmentos de alto peso molecular [Susin SA et al, 1999], mientras que la endonucleasa G se trasloca al núcleo y ocasiona



una fragmentación nucleosomal del ADN, produciendo el patrón característico en “escalera” observado mediante electroforesis del ADN de la célula apoptótica [Li LY et al, 2001].

En las células cancerosas las señales de supervivencia estarán aumentadas con respecto a las señales apoptóticas, como muestra la figura 14, por ello muchas moléculas en investigación van dirigidas a activar las vías apoptóticas de la célula tumoral y de esta manera a destruirla.



**Fig.14:** En el cáncer, incluido el de hígado, las señales de supervivencia celular están aumentadas con respecto a las señales apoptóticas. (Adaptado de Fabregat I et al, 2007)

**ii). Muerte celular por necrosis:** La necrosis es un tipo de muerte celular accidental que es inducida por agentes físicos o químicos, como por ejemplo cambios de pH, de temperatura, de presión parcial de oxígeno, etc. [Edinger AL et al, 2004], [Festjens N et al, 2006]. Debido a dichos factores se altera la permeabilidad de la membrana plasmática, por ello se produce un flujo anormal de iones hacia el interior celular que va acompañado de la entrada pasiva de agua lo que da lugar al hinchamiento, tanto de la célula como de algunos de sus orgánulos membranosos (mitocondria, retículo endoplásmico, etc). El resultado final suele ser que la membrana plasmática se rompe y se liberan los constituyentes citoplasmáticos, incluyendo enzimas proteolíticas. En la cromatina nuclear aparecen áreas de condensación desigual y el núcleo sufre una lenta disolución (cariolisis). La necrosis suele estar asociada a

reacciones inflamatorias.

**iii). Muerte celular por necroptosis:** La necrosis se ha interpretado durante muchos años como un proceso de muerte celular no programada; recientemente diferentes estudios han determinado que en algunas ocasiones este proceso de muerte celular posee un mecanismo de señalización bien regulado que es objeto de intensa investigación [Christofferson DE et al, 2010]. Los mismos ligandos que se van a unir a los receptores de muerte (TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL) y que producen la apoptosis van a poder producir también necroptosis. Al contrario que en la apoptosis, en la necroptosis las caspasas se encuentran inactivas y parece ser que la activación/inactivación de estas podría ser el interruptor molecular entre uno u otro tipo de muerte celular. Un punto clave en el mecanismo de señalización de la necroptosis es la proteína quinasa RIP1, que cuando se activa produce señales celulares que llevarán a la producción de muerte por necroptosis. El mecanismo celular propuesto es el siguiente: los ligandos mencionados se acoplan a los receptores de muerte en la membrana citoplasmática, esto producirá la activación de los dominios intracelulares de muerte donde se encuentra RIP1 unida a ubiquitina (formando parte del complejo I) que consecuentemente se activará e interaccionará en el citoplasma con la proteína RIP3, gracias a que RIP1 es desubiquitinada por la proteína *Lys63-deubiquitylating enzyme cylindromatosis* (CYLD), formando el complejo necroptótico Iib; como se puede apreciar en la figura 15. El complejo Iib puede promover en presencia de ceramidas, de calcio y de especies reactivas de oxígeno, la apertura mantenida del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria lo que produce una disfunción de la mitocondria provocando la formación exacerbada de especies reactivas de oxígeno en el citosol. En estas condiciones de estrés celular, la proteína Bmf se va a activar y va a interaccionar con las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL [Puthalakath H et al, 2001], inhibiéndolas. Toda esta sucesión de acontecimientos va a alterar la mitocondria, provocando una disminución acusada en los niveles de ATP y de NAD<sup>+</sup> intracelulares, este último por una posible activación sostenida de PARP, lo que dará lugar a la crisis energética que se produce en la célula y que lleva a la muerte por necroptosis o necrosis programada [Galluzzi L et al, 2008], [Hitomi J et al, 2008].

Dado que la necroptosis es un nuevo tipo de muerte celular programada, cuyos mecanismos moleculares se van descifrando, es previsible que en el futuro tenga

interesantes aplicaciones terapéuticas, como por ejemplo, en los tumores cuyas células son resistentes a la apoptosis [Christofferson DE et al, 2010], [Vandenabeele P et al, 2010].

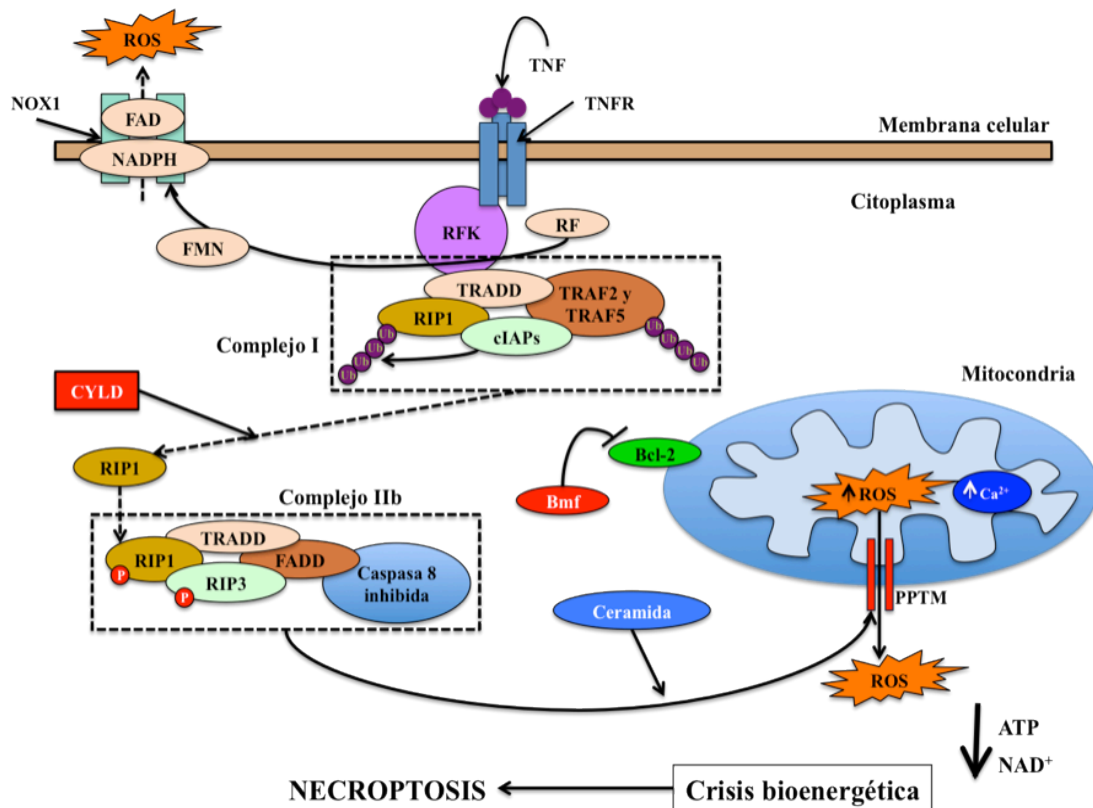


Fig.15: Mecanismo de señalización celular que da lugar a la necroptosis. (Adaptado de [Vandenabeele P et al, 2010] [Galluzzi L et al, 2008])

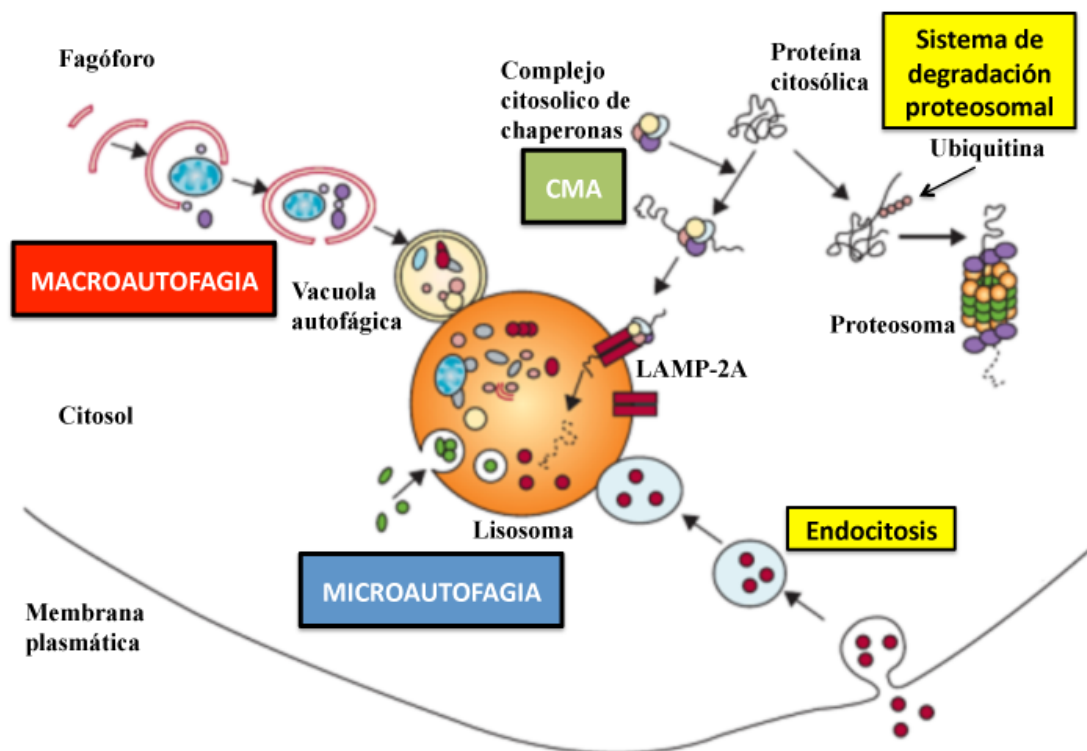
#### I.4.iii Autofagia

Uno de los procesos que ocurre en las células de manera habitual es la autofagia. La autofagia es un mecanismo de degradación de orgánulos y de material defectuoso en el interior de las vacuolas lisosomales de la propia célula. Es un proceso altamente conservado en la evolución, ya que se tiene constancia de la existencia de la autofagia en organismos como las levaduras y se da prácticamente en todas las células. El científico Christian de Duve, descubridor del lisosoma en 1955 y premio Nobel de

Fisiología y Medicina en 1974 por sus hallazgos sobre el mismo, es reconocido como el “padre de la autofagia” que ya describió en 1963 [Klionsky DJ, 2007].

Para que se produzca la autofagia hace falta el aporte de energía en forma de ATP, ya que se trata de un proceso catabólico y estrictamente regulado. La autofagia está implicada en muchos procesos celulares como son: el crecimiento celular, la morfogénesis y la diferenciación celular; también está implicada en la homeostasis celular (balance de síntesis-degradación de componentes celulares); en la adaptación a la privación de nutrientes y en la regulación de la actividad metabólica, participando en la eliminación de enzimas sobrantes en la remodelación tisular, en el envejecimiento y también es de vital importancia en la defensa celular, al participar en la eliminación de patógenos; a este último tipo de autofagia también se le conoce como xenofagia [Jackson WT et al, 2005].

Por todo lo anterior, la autofagia es un proceso celular que puede participar en el



**Fig.16: Esquema que muestra los diferentes tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. (Extraída de [http://www.mdc-berlin.de/en/research/research\\_teams/proteomics\\_and\\_molecular\\_mechanisms\\_of\\_neurodegenerative\\_diseases/research/research2/index.html](http://www.mdc-berlin.de/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2/index.html) y modificada)**

desarrollo del cáncer [Mathew R et al, 2007], enfermedades hepáticas [Rautou P et al, 2010], enfermedades inmunes, infección por patógenos, miopatías y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [Levine B et al, 2008].

Existen tres tipos de autofagia, que se muestran en la figura 16: la autofagia mediada por chaperonas (CMA), la microautofagia y la macroautofagia:

**a). Autofagia mediada por chaperonas (CMA):** Es un tipo de autofagia en la que se ven involucradas un tipo de proteínas denominadas chaperonas que están implicadas en el plegamiento de otras proteínas. Este proceso autofágico se va a encargar de degradar las proteínas que por impedimentos estéricos no se puedan degradar por la vía del proteosoma. Una condición indispensable es que presenten el motivo proteico KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), para que puedan ser reconocidas por ese sistema y puedan atravesar la membrana lisosomal. La diferencia con la macro y microautofagia es que en la autofagia mediada por chaperonas los materiales a degradar son transportados uno a uno a través de la membrana del lisosoma; y además se degradarán sólo proteínas y no orgánulos.

**b). Microautofagia:** Es un tipo de autofagia que consiste en que el lisosoma toma por invaginación los componentes citosólicos (incluyendo macromoléculas como el glucógeno) y orgánulos. Es un proceso que no está sometido a regulación metabólica.

**c). Macroautofagia:** Este tipo de autofagia se caracteriza por la presencia de vacuolas con dobles o múltiples membranas, cuya formación está muy conservada desde las levaduras a los humanos. La degradación por macroautofagia en células de mamíferos comienza con el secuestro del material celular para formar el autofagosoma temprano (primario). Se sugiere que la membrana de los autofagosomas tempranos proviene de una cisterna membranar, de origen desconocido, denominada fagóforo; en la formación del mismo podrán participar membranas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. En la figura 17 se muestra esquemáticamente como se va formando poco a poco la estructura del autofagolisosoma desde el fagóforo, pasando por el autofagosoma que se unirá al lisosoma para dar lugar al autofagolisosoma o vacuola autofágica [Xie Z et al, 2007]. En este orgánulo se produce la degradación proteolítica de los orgánulos secuestrados. Las proteínas del citoesqueleto son parte esencial en este proceso; el secuestro del material a degradar requiere de filamentos intermedios

(citoqueratina y vimentina), dado que el movimiento y fusión de los lisosomas con los autofagosomas maduros necesita el sistema de los microtúbulos. Todos estos pasos, incluido el de la degradación final del material secuestrado, necesitan energía en forma de ATP.

Hay situaciones que activan la autofagia como son el ayuno, el aumento de temperatura, la hipoxia, el estrés del retículo, la presencia de tóxicos, la radiación ultravioleta, la presencia de litio, la depleción de colesterol, el tratamiento con cannabinoides [Salazar M et al, 2009]. Entre las hormonas que activan la autofagia destaca el glucagón, mientras que la insulina posee un efecto antagónico. Cuando señales activadoras de la autofagia entran en contacto con la célula provocan la activación de diferentes cascadas de señalización que tienen como objetivo la inhibición de la diana celular mTOR (del inglés “mammalian target of rapamycin”) [Sabatini DM, 2006]; ésta es la vía clásica de activación de la autofagia, que pone en funcionamiento la maquinaria transcripcional de la célula para generar las proteínas necesarias que desencadenan el proceso autofágico. Cuando la célula se encuentra en condiciones favorables de crecimiento, la proteína mTOR, al estar activada, produce la fosforilación de Atg13 causando la pérdida de afinidad de ésta con Atg1 (Ulk1) y produciendo la inhibición de la autofagia. Pero cuando célula no está en estas condiciones y la proteína mTOR no se encuentra activa, no se fosforila Atg13 y por lo tanto permanece unida a Atg1, iniciándose de esta manera la señalización celular necesaria para que el proceso autofágico tenga lugar. Aumentará la expresión de la proteína beclina-1 que formará un complejo con Vps34 (un tipo de PI3K de clase III). Este complejo beclina/Vps34 será clave para que se produzca la activación de las proteínas necesarias para la expansión y formación de la vesícula autofágica. Entre estas proteínas se producirán reacciones de conjugación-desconjugación para formar un complejo final que se unirá al fagóforo con el fin de producir su expansión. Estas proteínas son del tipo Atg (del inglés “autophagy-related gene”) y el complejo final estará formado por Atg5-Atg12-Atg16. Para formar este complejo, la proteína Atg7 activará a Atg12 en un proceso ATP-dependiente, de manera que se forma un dímero Atg7-Atg12. A continuación, la proteína Atg12 activada se unirá a Atg10, liberando Atg7. Atg10 es una enzima que catalizará la unión posterior de Atg12 con Atg5 a través de un enlace peptídico entre una glicina de Atg12 y una lisina de Atg5. El dímero Atg12-Atg5 se fusionará finalmente con Atg16



formándose el complejo Atg5-Atg12-Atg16, que se dispondrá formando tetrámeros.

Por otro lado, la proteína pro-LC3 se activará fragmentándose por la acción de la proteasa Atg4 para dar LC3-I, que a continuación se unirá a través de una glicina libre a la proteína Atg7, la cual activará enzimáticamente a LC3-I para que se una a Atg3 y se forme el dímero Atg3/LC3-II. La proteína LC3-II se conjugará en este punto con la fosfatidiletanolamina (PE) y quedará unida a la membrana del fagóforo [Yang Z et al, 2009].

Una vez que la célula tiene los elementos necesarios para llevar a cabo el proceso, se producirá la formación de la vesícula autofágica, iniciándose por la producción del fagóforo. Como he indicado anteriormente, no se conoce bien el origen del fagóforo, pero se postula que en su producción podrían participar el aparato de Golgi y la mitocondria [Tooze SA et al, 2010]. Una vez que se produce la expansión del fagóforo, se producirá el secuestro del material dañado (orgánulos, proteínas, patógenos, etc) para

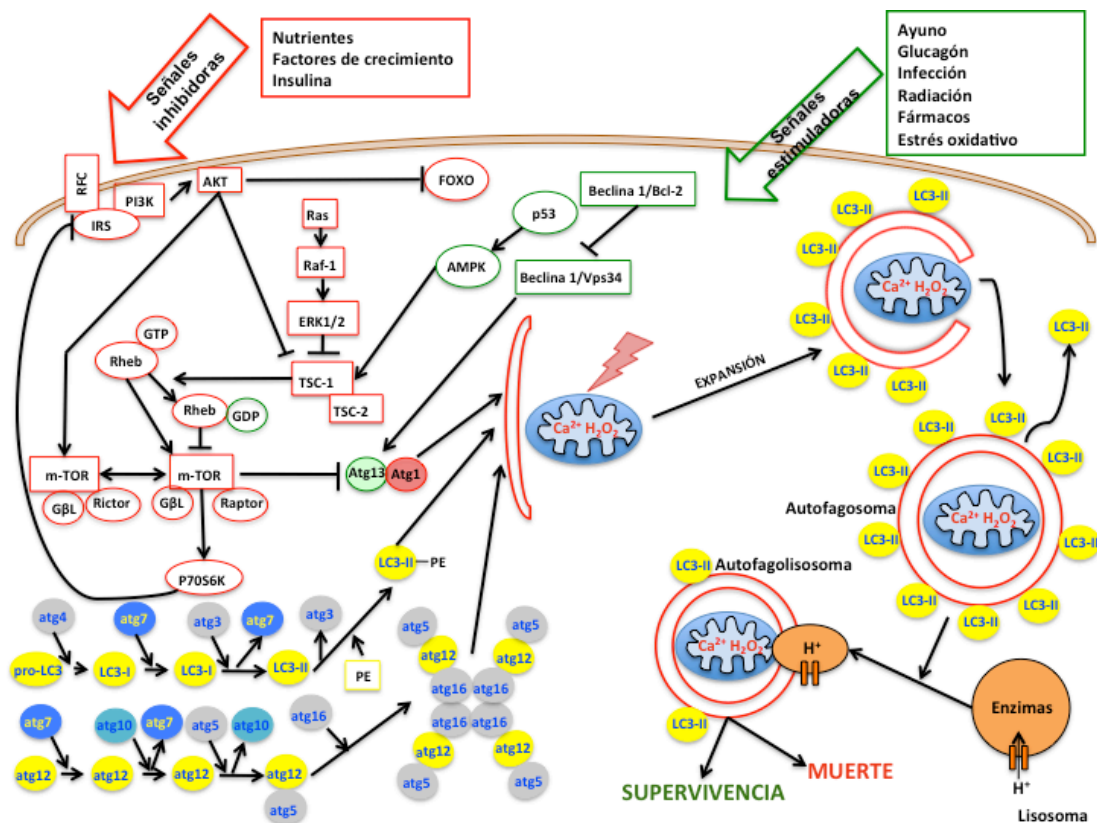


Fig.17: Esquema que muestra parte de la señalización que ocurre en la célula cuando se produce macroautofagia. (Modificada de [Yang Z et al, 2009] y de Enzo® Life Sciences)

su posterior degradación. Tendremos en este momento formado el autofagosoma, que se fusionará con el lisosoma para dar como resultado el autofagolisosoma o vesícula autofágica. El pH ácido que proporciona el lisosoma será esencial para la degradación del material de la vesícula autofágica. Una vez que se produzca la degradación proteolítica de los componentes de la vesícula autofágica, se podrán reciclar los aminoácidos u otras moléculas para que la célula las pueda reutilizar.

#### I.4.iv Senescencia celular

La senescencia es un estado celular que tiene lugar cuando la célula pierde la capacidad para proliferar, de forma irreversible [Campisi J et al, 2011]. Se describió formalmente hace más de 45 años por el científico estadounidense Leonard Hayflick [Hayflick L, 1965]. Existen diferentes mecanismos que conducen a la senescencia, uno de los más conocidos se debe a la erosión telomérica que causa pérdida de ADN en los extremos de los cromosomas en cada una de las divisiones celulares al final de la fase de síntesis (S), resultando con esto la pérdida de un fragmento del mismo en el extremo del cromosoma [Bodnar AG et al, 1998]. Estos telómeros erosionados pueden generar un daño persistente en el ADN lo que detiene el ciclo celular dando lugar a la senescencia [d'Adda di Fagagna F et al, 2003]. También hay células que pueden volverse senescentes sin necesidad de presentar daño persistente en el ADN, por pérdida, por ejemplo, del supresor de tumores PTEN o por la sobreexpresión de los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina, como por ejemplo de p21 o p16 [McConnell BB et al, 1998].

Las principales características de las células senescentes son las siguientes [Rodier F et al, 2011]:

- a) La parada del ciclo celular que se produce es esencialmente permanente y no puede revertirse por estímulos fisiológicos. Sin embargo, algunas células senescentes que no expresan p16 pueden volver a proliferar después de la inactivación del supresor de tumores p53.
- b) Las células senescentes aumentan su tamaño alcanzando a veces más del doble que el de las células no senescentes.



c) Expresan una enzima conocida como  $\beta$ -galactosidasa lo cual se asocia a la senescencia celular y que en parte refleja el incremento en la masa lisosomal.

d) La mayoría de las células senescentes expresan la proteína p16, lo cual no es común en las células quiescentes. Dicha proteína puede producir la formación de focos o acúmulos de heterocromatina por activación del supresor de tumores Rb, lo que silencia genes implicados en la proliferación celular. Además p16 es inducido por estrés celular y por daño en el ADN incrementándose con la edad en los ratones y en humanos, estando su actividad relacionada con la disminución en el número de células progenitoras que se produce durante el envejecimiento en múltiples tejidos.

e) Las células senescentes con daño persistente en el ADN secretan factores de crecimiento, proteasas, citoquinas, y otras moléculas que tienen potente actividad autocrina y paracrina.

Por todo esto y por otras investigaciones realizadas por diferentes autores se

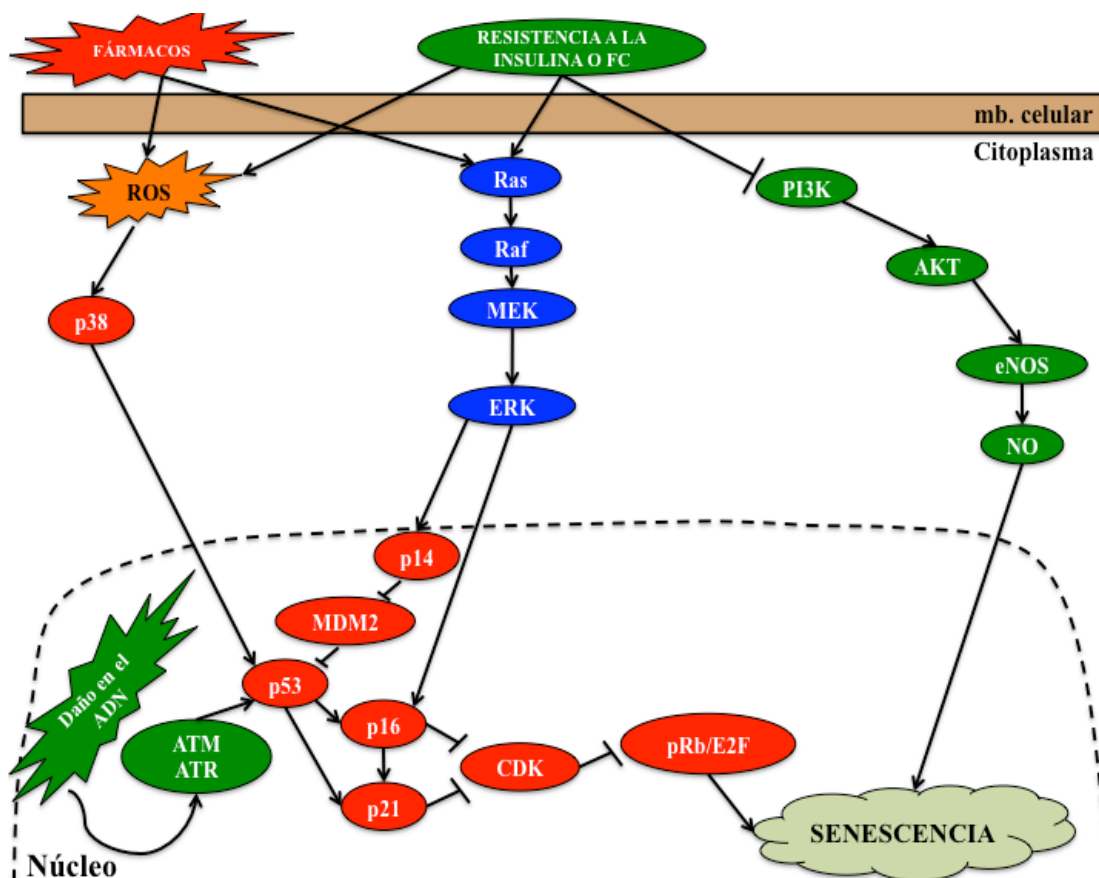


Fig.18: Esquema simplificado del mecanismo de activación de la senescencia celular. FC: Factor de crecimiento. (Modificada de [Yin Z et al, 2012] [Vergel M et al, 2010])

puede afirmar que la senescencia es un proceso celular de gran importancia para el desarrollo del cáncer. El proceso senescente en una célula puede activarse a través de varios mecanismos independientes del daño en el ADN, como son la activación de los oncogenes Ras, Raf, AKT, PIM, CDC6, ciclina E o STAT5; desembocando la activación de estos en dos vías de señalización directamente relacionadas con la senescencia: la vía de p14ARF/p53/p21 y la vía INK4/CDK/Rb, como se muestra en la figura 18.

La senescencia es un fenómeno que ha sido relacionado con la autofagia. Algunos autores han descrito que cuando se produce la activación de algunos oncogenes, como Ras o MEK, se inicia el mecanismo de autofagia que es esencial para el establecimiento del fenotipo senescente [Young AR et al, 2009] [White E et al, 2009] ya que cuando se utiliza la tecnología de silenciamiento con siARN de los genes relacionados con la autofagia (ATG), se produce una disminución en el número de células en estado senescente [Gewirtz DA, 2009] [Young AR et al, 2009]. Además, la acumulación de autofagosomas ha sido demostrada en fibroblastos en senescencia [Gerland LM et al, 2003], así mismo se ha observado que la inhibición farmacológica de la autofagia interfiere el mecanismo senescente en células endoteliales [Patschan S et al, 2008]. Sin embargo, aún no está muy claro si la autofagia es anterior a la senescencia o si son procesos celulares que ocurren a la vez [Gewirtz DA, 2009].

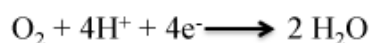
#### **I.4.v Estrés oxidativo**

Los organismos aerobios, como el ser humano, necesitan reducir el oxígeno para dar agua en la mitocondria con el objetivo de obtener la energía necesaria en forma de ATP. En dicho proceso de óxido-reducción se originan radicales libres.

Los radicales libres son aquellas especies químicas que poseen un electrón desapareado en el orbital más externo. Estas especies radicálicas pueden provocar daños en nuestro organismo porque modifican macromoléculas como los lípidos, las proteínas o el ADN, dichas reacciones pueden facilitar el desarrollo de enfermedades como el cáncer, el Alzheimer, la enfermedad de Huntington, el Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica o la esclerosis múltiple entre otras [Melo A et al, 2011]. Además del origen natural de los radicales libres hay otras causas que provocan la producción de radicales

libres en el organismo, como son por ejemplo la radiación ultravioleta, el tabaco, las radiaciones ionizantes, los xenobióticos y la polución aérea entre otras multiples causas.

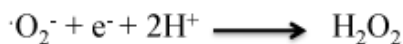
Un punto clave en la producción de radicales libres es la reacción catalizada por el complejo IV de la cadena de transporte electrónico mitocondrial en la que se produce la reducción del oxígeno para dar agua. La reacción que se produce en el complejo IV es la que sigue:



La mayoría del oxígeno se reduce de esta forma pero un 5% sufre reacciones de reducción univalente o de incorporación de un electrón generando radicales libres. El primero de estos radicales libres es el radical superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ):



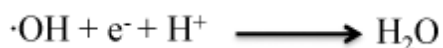
El anión superóxido puede incorporar otro electrón para producir peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que aunque no es un radical libre es una especie que presenta alta reactividad y es de por sí muy oxidante:



Si el peróxido de hidrógeno gana otro electrón se producirá una molécula de agua y un nuevo radical libre, el radical hidroxilo, que es una especie reactiva de oxígeno (ROS) muy peligrosa para el organismo ya que produce daño en macromoléculas importantes como los lípidos, las proteínas e incluso en el ADN [Sayre LM et al, 2008]. Se forma de la siguiente manera:



Finalmente el último de los cuatro electrones reducirá el radical hidroxilo a agua:



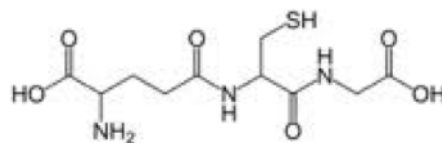
La oxidación de macromoléculas, como los lípidos o los ácidos nucleicos, genera subproductos que pueden cuantificarse y que indican el grado de estrés oxidativo

a que está sometida una célula y por ende, un tejido. Pero a veces los niveles elevados de estos marcadores no sólo reflejan un aumento del estrés oxidativo sino también un trastorno de los sistemas de degradación de las proteínas dañadas, como el proteosoma [Sayre LM et al, 2008].

Para contrarrestar el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre la célula, el organismo posee una serie de defensas antioxidantes de tipo enzimático y de tipo no enzimático, capaces de inactivar las especies reactivas. Dentro de la categoría de los agentes antioxidantes no enzimáticos tenemos moléculas que por su estructura característica van a poder reaccionar con los radicales libres para estabilizarlos. Estas moléculas son por ejemplo la vitamina E, el ácido ascórbico, el  $\beta$ -caroteno y el licopeno. Dentro de la categoría de los agentes antioxidantes enzimáticos tenemos tres enzimas principales: la catalasa (CAT), la superóxido dismutasa (SOD) y la glutathion peroxidasa (GPX). La CAT es capaz de transformar el peróxido de hidrógeno en agua, la SOD es capaz de transformar los aniones superóxido en peróxido de hidrógeno y la GPX es capaz de reducir el peróxido de hidrógeno a agua. La acción de la GPX requiere de la acción reductora del glutathión (GSH) que se oxidará a disulfuro de glutathión (GSSG), con la reducción concomitante de peróxido de hidrógeno a agua. La reacción es la siguiente:



El glutathión (GSH) es un tripéptido formado por la unión de tres aminoácidos (glutámico, cisteína y glicina). Es un compuesto químico nucleofílico debido al átomo de azufre del aminoácido cisteína, por lo tanto va a



**Fig.19: Estructura química del glutathión**

poder atacar a las especies reactivas de oxígeno (ROS) reduciendo las mismas a especies no reactivas. El glutathión se sintetiza en dos pasos, de manera dependiente de ATP, gracias a la acción de la enzima  $\gamma$ -glutamil-cisteinil sintetasa (GCS), que cataliza el primer paso, el cual es el limitante para la síntesis de glutathión. Se ha comprobado la importancia de dicha enzima, en experimentos realizados en ratones donde se ha

silenciado el gen que codifica esta proteína observando que los animales mueren al llegar al mes de vida [Chen Y et al, 2007]. El segundo paso está mediado por la acción de la enzima glutatión sintetasa (GSH sintetasa).

El hígado, gracias a los hepatocitos, es un órgano que contiene altos niveles de GSH, lo que es necesario en el metabolismo y biotransformación de los fármacos. En ocasiones, se puede observar hepatotoxicidad debido a la generación y acumulación de ROS como consecuencia del exceso en la biotransformación de los fármacos y la consiguiente disminución de los niveles de GSH. En general, los altos niveles de GSH protegen de la hepatotoxicidad. Para los estudios de la función de GSH en hepatocitos se usa comúnmente L-butionina [R,S] sulfoximina (BSO) que es un inhibidor de la enzima GCS y por lo tanto un inhibidor de la síntesis de glutatión, de manera que deplecciona los niveles de GSH en la célula y aumenta la generación de ROS.

Una molécula que provoca el efecto contrario al BSO, es la N-acetilcisteína (NAC) ya que da lugar a cisteína, la cual es precursora del glutatión.

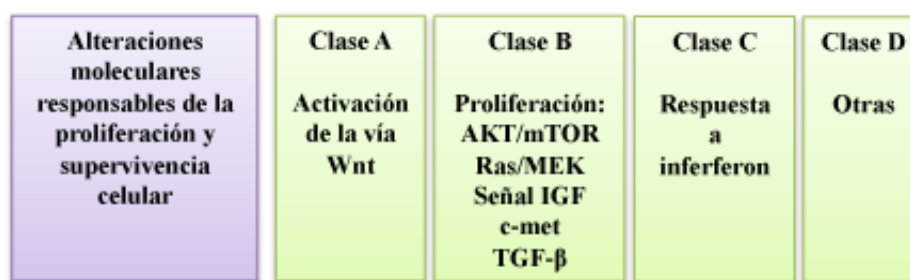
### **1.5 Clasificación molecular del hepatocarcinoma**

Debido al gran número de conocimientos adquiridos en los últimos años sobre los mecanismos moleculares implicados en la biología del cáncer, se está intentando clasificar el hepatocarcinoma utilizando criterios moleculares. Se ha especulado que para que se desarrollen tumores sólidos (como el HCC) en los individuos sanos, hacen falta al menos tres alteraciones críticas en las vías de señalización celular, mientras que se necesita sólo una para los tumores hematológicos (como la leucemia mieloide crónica) [Vogelstein B et al, 2004]. Estas alteraciones en las vías de señalización celular se pueden producir por causas muy variadas como por ejemplo por la alteración en el número de copias, o por cambios epigenéticos; también se pueden producir como resultado de la inactivación de genes supresores de tumores (normalmente por la inactivación de los dos alelos) lo que provoca la pérdida de heterocigosis, por mutaciones puntuales, por silenciamiento epigenético o por transcripción aberrante de las proteínas supresoras lo que hace que pierdan su dominio activo.

En general, para que el cáncer se desarrolle se necesita que concurren varios procesos en las células tumorales: que haya autosuficiencia en las señales de

crecimiento, que las células no sean sensibles a señales de apoptosis y por lo tanto que evadan la apoptosis, que posean un potencial de replicación sin límite, que generen señales de angiogénesis estable, que adquieran capacidad invasiva y finalmente que sean capaces de generar metástasis [Hanahan D et al, 2000]. En el hepatocarcinoma se dan muchas de estas características: el primer paso que se produce normalmente es la desregulación del ciclo celular (ocurre en la mitad de los casos) debida a la mutación puntual en TP53, silenciamiento de p16, de los genes del retinoblastoma (Rb), o a la sobreexpresión de la ciclina D1; el segundo paso es la producción de angiogénesis aberrante como resultado de la secreción autocrina y paracrina del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o de la angiopoyetina-2; el tercer paso es la evasión por parte de la célula hepática del proceso de apoptosis, debido a la desregulación tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca; y como último paso la reactivación de la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) lo cual asegura la replicación celular sin límite [(A) Llovet JM et al, 2008].

En esta clasificación molecular del hepatocarcinoma se distinguen cuatro grupos (figura 20) dependiendo de las alteraciones moleculares responsables de la proliferación celular y de la supervivencia en el hepatocarcinoma:



**Fig.20: Esquema de la clasificación molecular del hepatocarcinoma. (Modificado de (A) Llovet JM et al, 2008)**

La **Clase A** trata de las alteraciones moleculares que ocurren en la vía de señalización celular de Wnt, conocida como vía de Wnt/ $\beta$ -catenina la cual consiste en la activación de la vía Wnt acompañada de mutaciones en el exón 3 del gen de la  $\beta$ -catenina (CTNNB1). Como consecuencia se previene la ubiquitinación de la  $\beta$ -catenina, provocando su translocación al núcleo y la transactivación de sus genes diana. Como consecuencia se activan las vías celulares que promueven la diferenciación y la

proliferación. Cuando el hígado está sano, esta vía de señalización normalmente se encuentra inactivada porque la  $\beta$ -catenina se encuentra secuestrada por el complejo de destrucción de  $\beta$ -catenina, compuesto por las proteínas supresoras de tumores, Axin y APC, y por las proteínas Ser/Thr quinasas CK1 (caseína quinasa 1) y GSK3 $\beta$ . Como consecuencia la  $\beta$ -catenina se encuentra fosforilada y ubiquitinada y se degrada en el proteosoma. En el hepatocarcinoma se generan mutaciones en CTNNB1, lo que hace que la ruta de señalización esté activada constitutivamente en el tumor, y por lo tanto la  $\beta$ -catenina no se fosforile y no se degrade, traslocándose al núcleo y produciendo la transactivación de sus genes diana [Takigawa Y et al, 2008]. No existen fármacos para el tratamiento del hepatocarcinoma dirigidos contra esta ruta de señalización [(A) Llovet JM et al, 2008].

**La Clase B** está muy asociada a un aumento en la proliferación, a la inestabilidad cromosómica y a la activación de la señalización de las vías Ras/MEK y AKT/mTOR mediante IGFs, c-met y TGF- $\beta$ .

La vía Ras/MEK es conocida como la ruta de señalización de las MAPK (vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos). Los ligandos EGF (factor de crecimiento epidérmico), HGF (factor de crecimiento del hepatocito), PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) y VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular), entre otros, activan la vía de señalización Ras/MAPK, mediante su unión a los receptores del tipo tirosin-quinasa (EGFR, HGFR, PDGFR o VEGFR) con la consiguiente fosforilación de los mismos. Posteriormente, a través de la cascada de señalización de las proteínas *Grb2/Sos/Ras/Raf/Mek/Erk*, inducen la transcripción de genes de la familia AP1, como *c-fos* y *c-jun*, los cuales son elementos claves para la proliferación celular. En una célula tumoral, algunas proteínas de esta vía pueden mutar y permanecer constitutivamente activas, lo que provocaría una proliferación descontrolada. En el caso del hepatocarcinoma, la estimulación continua de la vía de Ras/MAPK se produce por la activación de señales del inicio de la ruta (receptores) o por la inactivación epigenética por metilación de genes supresores de tumores, como es el caso de los genes *NORE1A* y *NORE1B* [Macheiner D et al, 2006]; sin embargo, no es frecuente la aparición de mutaciones en Ras.

Muchas terapias que se encuentran en ensayos clínicos tienen como diana los receptores del tipo tirosin-quinasa de esta vía. Además la única molécula que está



aprobada para el tratamiento del hepatocarcinoma, el Sorafenib, actúa en esta ruta de señalización inhibiendo B-Raf [Wilhelm S et al, 2006].

La vía PI3K/AKT/mTOR es una vía de señalización celular que juega un rol crítico en la carcinogénesis [Sabatini DM, 2006]. En esta ruta, AKT (también conocida como proteína quinasa B, PKB) puede ser activada a través de los receptores del tipo tirosin-quinasa (EGFR e IGFR), a través de la activación constitutiva de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinasa) o a través de la pérdida de función del gen supresor de tumores PTEN debido al silenciamiento epigenético o por mutaciones somáticas. Las mutaciones de PTEN podrían conferir resistencia a los agentes terapéuticos que tienen como diana el EGFR.

El factor de crecimiento relacionado con la insulina o IGF-1 se une a su respectivo receptor de membrana citoplasmática, provocando su propia fosforilación en restos de tirosina. Posteriormente dicha región es reconocida por el IRS-1 (sustrato del receptor de insulina 1) que recluta a la proteína PI3K; esta última enzima a su vez transforma PIP2 (fosfatidilinositol bifosfato) en PIP3, fosfolípido que activa PDK1 la cual a su vez activa a la enzima AKT/PKB por fosforilación (Figura 21). La proteína AKT actúa impidiendo que la célula entre en apoptosis porque inhibe por fosforilación a la proteína proapoptótica Bax impidiendo su translocación a la mitocondria; AKT también puede regular la síntesis de proteínas mediante la activación de mTOR (por acción de Rheb) que posteriormente activa la proteína p70S6K, la cual favorece la síntesis de proteínas en el ribosoma y por lo tanto interviene en la regulación del ciclo celular.

En esta vía de señalización, mTOR es un regulador del crecimiento y de la proliferación, al ser sensible a la captación de los nutrientes o a la privación de estos, permitiendo la progresión en el ciclo celular desde la fase G1 hasta la fase S.

La proteína mTOR en la célula puede estar formando dos complejos: mTORC1 (complejo 1 de la diana de la rapamicina en mamíferos) y mTORC2 (complejo 2 de la diana de la rapamicina en mamíferos). Esos dos complejos, que tienen en común la proteína mLST8/GβL, se distinguen en que mTORC1 contiene la proteína *raptor* (proteína reguladora asociada de mTOR) y mTORC2 contiene la proteína *riCTOR* (acompañante de mTOR insensible a la rapamicina). Mientras que el complejo mTORC1 se inhibe por rapamicina, mTORC2 no se ve afectado por ésta. La mayoría de



los trabajos realizados en células de mamíferos se focalizan en el estudio del complejo mTORC1 y se han caracterizado, como sustratos de éste, la proteína 4EBP1 y las proteínas p70S6K1 y p70S6K2, implicadas en el crecimiento celular y en el control de la traducción de ARN [Wullschleger S et al, 2006].

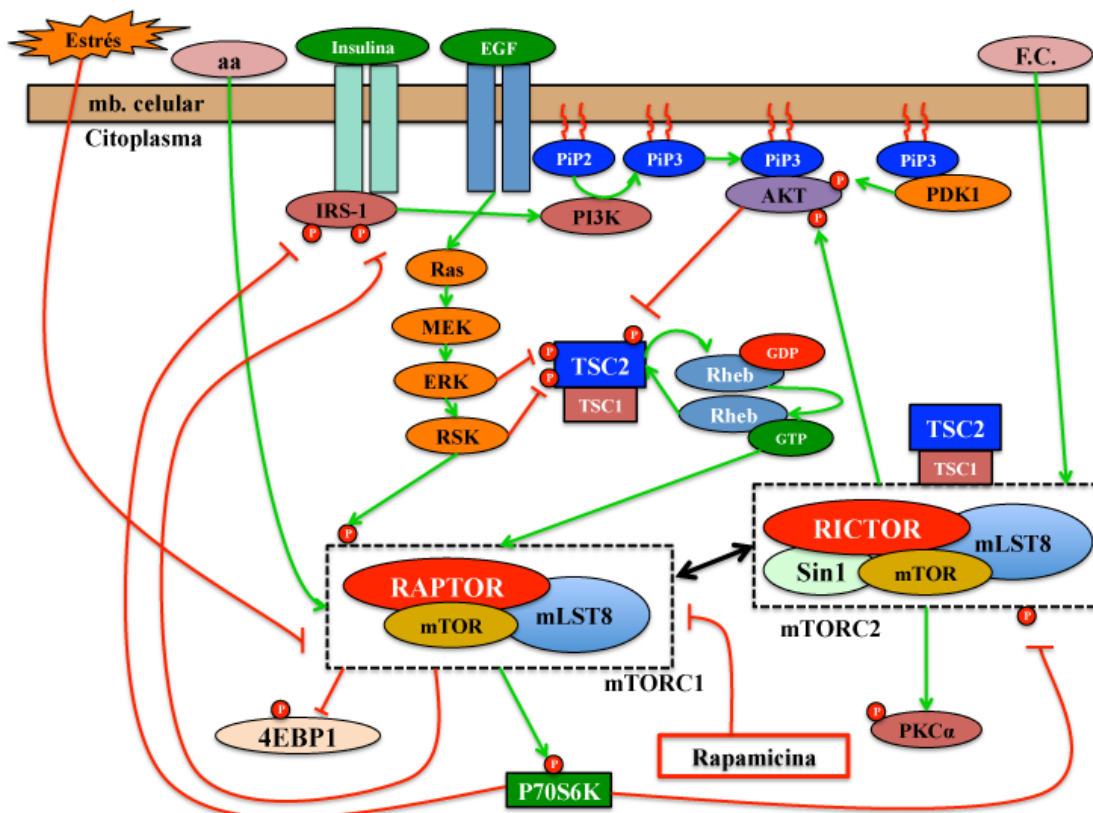
El complejo mTORC1 puede ser activado por diferentes vías de señalización, como la vía de las MAPKs o la vía de PI3K/AKT, que fosforilarán la proteína TSC2 inhibiéndola, lo que produce la activación de la proteína Rheb unida a GTP, la cual provoca la fosforilación de mTOR y posterior activación del complejo mTORC1. Dicha activación de mTORC1 inhibirá la acción supresora de la proteína 4EBP1 sobre el factor de iniciación de la traducción, eIF4E y por otro lado activará por fosforilación la proteína p70S6K promoviendo también con ello el proceso de traducción y la subsiguiente síntesis de proteínas [Huang J et al, 2009]. Por el contrario, el complejo puede ser inhibido por la disminución de nutrientes o por hipoxia, así como por la rapamicina [Shaw RJ et al, 2006]. El complejo mTORC1, como se ha comentado, es una diana importante para tratar diferentes enfermedades como el cáncer [Guertin DA et al, 2005].

El complejo mTORC2, es el menos estudiado por el momento. Está regulado por insulina, factores de crecimiento y nutrientes. Diferentes autores han mostrado su papel como regulador del citoesqueleto celular a través de la estimulación de las fibras de estrés de F-actina, de la paxilina (proteína adaptadora), de las proteínas G pequeñas RhoA y Rac1, de Cdc42 y de la proteína quinasa C alfa (PKC $\alpha$ ) [Sarbasov DD et al, 2004]. El complejo mTORC2 fosforila AKT en el residuo de serina 473, que junto con una segunda fosforilación de AKT en el residuo de treonina 308 por PDK1, conlleva a la activación completa de AKT [Sarbasov DD et al, 2005]. Originalmente, mTORC2 fue identificado como una entidad insensible a la rapamicina, ya que la exposición a la misma no alteraba la fosforilación de AKT; sin embargo, algunos estudios han revelado que la exposición crónica de algunas líneas celulares a la rapamicina produce la inhibición de la formación de nuevos complejos mTORC2 [Wu MJ et al, 2012], [Akccakanat A et al, 2007], [Sarbasov DD et al, 2006].

Además, mTOR es una diana clave en la autofagia. Como hemos visto anteriormente es una proteína sensible a los nutrientes y, por lo tanto, en situación de ayuno mTOR no se fosforila y se activa la autofagia. Este proceso está siendo muy

estudiado en los últimos años y se cree que puede tener una importancia capital en la regulación del desarrollo del cáncer y por lo tanto en la investigación de nuevos agentes terapéuticos para este conjunto de enfermedades.

En el caso del hepatocarcinoma, mTOR permanece activado y se puede bloquear por inhibidores como la Rapamicina o el Everolimus, inhibiendo el crecimiento de las células cancerígenas tanto *in vitro* como en modelos experimentales. Estos inhibidores están en desarrollo clínico, como veremos más adelante al abordar el tema del tratamiento sistémico del cáncer de hígado.



**Fig.21:** Esquema de la señalización celular de los complejos mTORC. *aa* (aminoácidos), *F.C.* (factores de crecimiento). (Modificado de [Julien LA et al, 2010] [Foster KG et al, 2010] [Wu MJ et al, 2010] [Huang J et al, 2009])

En relación a *c-met*, esta es una proteína de membrana que reconoce al factor de crecimiento del hepatocito (HGF), lo que activa la señalización de diferentes vías como por ejemplo, las vías de Ras, de PI3K, de STAT3 y de  $\beta$ -catenina. La desregulación de *c-met* y de HGF es algo común en el hepatocarcinoma. Dicha cascada de señalización está aumentada en el hepatocarcinoma [(A) Llovet JM et al, 2008]. La activación de *c-*

met por HGF induce un desacoplamiento de las células que están en contacto permitiendo la migración hacia lugares adyacentes, por ello el sistema HGF/c-met es el más importante durante la migración celular en la embriogénesis y estudios previos han revelado que es fundamental en la capacidad invasiva durante la progresión tumoral y la metástasis [Takayama H et al, 1997]. También se ha demostrado su importancia utilizando modelos de carcinogénesis *in vivo* como por ejemplo en el xenotransplante de células tumorales en ratones atímicos. En este modelo se ha anulado la expresión de c-met con ARN de interferencia demostrando una disminución de la proliferación, de la invasión celular y de la supervivencia; lo cual subraya la importancia de esta vía de señalización en el hepatocarcinoma [Lutterbach B et al, 2007].

El sistema de señalización de IGF (factor de crecimiento similar a la insulina) es un regulador esencial en: el crecimiento y desarrollo de los mamíferos, así como en la patogénesis del cáncer de hígado y de otros órganos como por ejemplo del cáncer de mama, de próstata, de pulmón o de colon [Sachdev D et al, 2007]. Estudios epidemiológicos e investigaciones realizadas con modelos *in vivo* coinciden en señalar que elevados niveles circulantes de IGF-I están asociados con un mayor riesgo de desarrollar cáncer y, en concreto, hepatocarcinoma [Pollak MN et al, 2004]. Hay dos tipos de factores de crecimiento similares a la insulina, IGF-1 e IGF-2, y cada uno de estos factores tiene su propio receptor transmembrana, IGF1R e IGF2R, respectivamente. Aunque los dos IGFs pueden activar el IGF1R, el receptor de IGF-1 (IGF1R) posee actividad tirosin-quinasa y el receptor de IGF-2 (IGF2R) está involucrado en la internalización y degradación del IGF-2, comportándose el IGF2R como un supresor de tumores. Con este papel también pueden actuar otras proteínas conocidas como proteínas que unen IGFs (IGFBPs). En un 30% de los pacientes con hepatocarcinoma existe sobreexpresión de IGF-2, mutaciones puntuales o deleciones cromosómicas en IGF2R que impiden degradar el IGF-2. Así mismo se ha observado la disminución de los supresores de tumores IGFBPs (IGFBP-1, IGFBP-3 e IGFBP-4) por cambios epigenéticos debidos a la hipermetilación de sus correspondientes promotores [Breuhahn K et al, 2006].

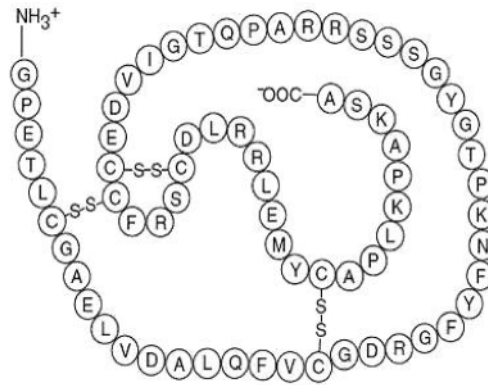
El IGF-1, también conocido como somatomedina C, es una hormona relacionada estructuralmente con la insulina. Está formado por 70 aminoácidos dispuestos en una cadena que contiene tres puentes disulfuro. Posee un peso molecular de 7649 Dalton. Se

sintetiza en el hígado aunque otros tejidos son capaces de producirlo para que actúe de manera local. La producción hepática de IGF-1 y su liberación a la sangre están reguladas principalmente por la hormona del crecimiento (GH), que se produce en la glándula pituitaria bajo el control de la hormona liberadora de GH

(GHRH) y de la somatostatina (SS). La concentración sistémica de IGF-1 aumenta paralelamente a la de GH durante el crecimiento postnatal y en la adolescencia [Foulstone E et al, 2005]. El IGF-1 sintetizado por los hepatocitos ejerce funciones endocrinas y es responsable, junto con la GH, del control del crecimiento y la diferenciación de la mayor parte de los tejidos del cuerpo. Ambos factores pueden ejercer también efectos autocrinos o paracrinos, los cuales constituyen una parte importante de las funciones del IGF-1. Esto ocurre en algunas células tumorales permitiendo que puedan seguir proliferando gracias a que el IGF-1 es un factor de crecimiento muy potente. De hecho, se han realizado estudios epidemiológicos que subrayan la importancia del IGF-1 en el desarrollo de tumores, ya que individuos con síndrome de Laron con muy bajos niveles de IGF-1 presentan una baja incidencia de cáncer [Steerman R et al, 2011].

El receptor de IGF-1 (IGF1R) presenta actividad tirosin-quinasa y está relacionado funcional y estructuralmente con el receptor de insulina, encontrándose en la mayoría de los tejidos. Está constituido por un dominio extracelular, con dos subunidades  $\alpha$  que actúan como lugar de unión al ligando, y por dos subunidades transmembrana  $\beta$ , que poseen la función catalítica.

La mayor parte de los efectos del IGF-1 derivan de la activación del IGF1R. Cuando el IGF-1 se une al dominio extracelular del receptor, se produce un cambio conformacional en las subunidades  $\beta$  transmembrana que ocasiona la autofosforilación de su dominio citoplasmático con actividad tirosin-quinasa [LeRoith D et al, 2003]. Esta activación del receptor ocasiona la fosforilación, a su vez, de residuos de tirosina



**Fig.22: Secuencia de aminoácidos que posee la estructura del IGF-1.**

adicionales situados en los dominios yuxtamembrana y carboxilo-terminales que flanquean el dominio tirosina quinasa. Dichos residuos fosforilados van a actuar como sitios de anclaje para proteínas adaptadoras, como los sustratos del receptor de insulina (IRSs), que a su vez, serán fosforilados por el receptor. Una vez fosforilados, los IRSs actúan reclutando otros factores, como Grb2/SOS y la subunidad reguladora (p85) de la PI3K. Estos factores estimularán, sobre todo, la ruta de señalización de PI3K/AKT/mTOR y la de las MAPK, respectivamente.

Esta vía de señalización está siendo muy estudiada con el objetivo de bloquearla para sensibilizar a las células cancerosas y así disminuir la resistencia de los tumores a diferentes agentes terapéuticos en fase de desarrollo, como algunos anticuerpos contra el receptor de IGF-1, así como de pequeñas moléculas que inhiben la actividad enzimática de los receptores de IGFR, que se mencionarán más adelante.

Los IRSs, o sustratos del receptor de insulina son proteínas que modulan funciones celulares básicas, como: el crecimiento, el metabolismo, la supervivencia y la diferenciación. Son proteínas que carecen de actividad catalítica, pero poseen diferentes dominios y también sitios de fosforilación que mediarán en las interacciones con distintas proteínas adaptadoras o con actividad quinasa o fosfatasa. Fundamentalmente, los IRSs van a transmitir la señal desde los receptores de membrana, tanto de insulina como de IGF-1, a las vías de señalización de las MAPKs y de PI3K. La transmisión de esta señal hacia las rutas de señalización mencionadas producirá, en general, la activación de la proliferación y la inhibición de la apoptosis.

Se conoce la existencia de seis tipos de sustratos de receptor de insulina: IRS-1, IRS-2, IRS-3, IRS-4, IRS-5/DOK4 e IRS-6/DOK5 [Escribano et al, 2003], [Sun XJ et al, 1991], [Araki E et al, 1994], [Choi WS et al, 2000], [Lavan BE et al, 1997], [Cai D et al, 2003]. Los más estudiados son el IRS-1 y el IRS-2. En la figura 23 se muestran las diferentes estructuras de los IRSs; se hará mención especial al IRS-1, ya que es el sustrato del receptor de insulina que tiene más relevancia en los experimentos que se realizan en esta tesis. Como se puede apreciar en la figura 23, todos los IRSs poseen dos dominios conservados: un dominio de homología a pleckstrina (PH), hacia el extremo amino terminal, y un dominio de unión a fosfotirosina (PTB). Además posee un dominio cercano al extremo carboxilo terminal, de tamaño variable, que posee diferentes sitios de fosforilación en serina y tirosina. Las fosforilaciones que se

produzcan en este dominio de fosforilación podrán ser activadoras o inhibidoras. Los dominios PH y PTB participan en interacciones específicas con los fosfolípidos de membrana, con los receptores de insulina (dominio PH) o con los receptores de IGF-1 (PTB) [White MF, 2002]. Los residuos de tirosina fosforilados de los IRSs actúan como puntos de anclaje para otras proteínas que tienen dominios de unión SH2, como la subunidad reguladora de la PI3K (P85). Los IRSs también pueden reclutar proteínas con actividad enzimática del tipo tirosina fosfatasa como la proteína SHP2. Los sitios de fosforilación en serina que presenta el IRS-1 en su estructura, tienen una función diferente; cuando la proteína p70S6K fosforila el residuo de Ser307 del IRS-1, se inhibe parcialmente su función adaptadora y se induce su degradación por la vía del proteosoma [Haruta T et al, 2000].

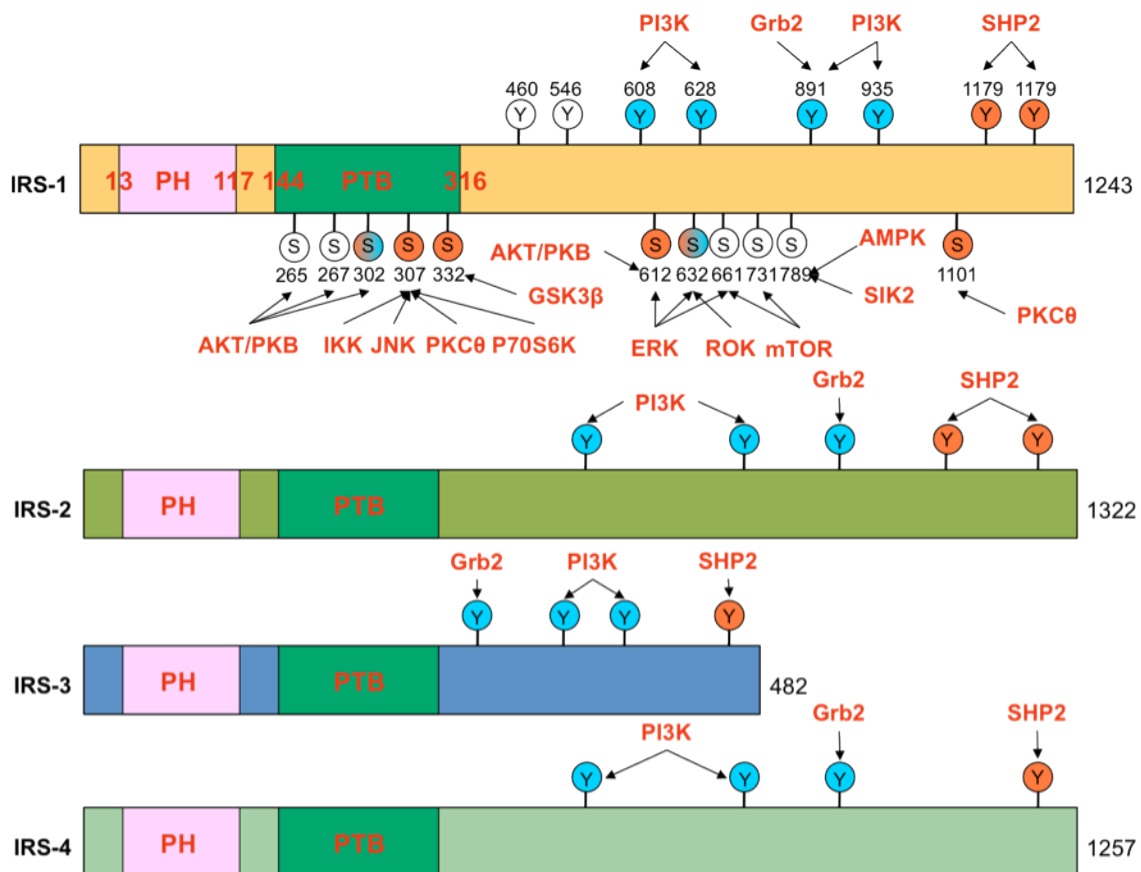
El IRS-1 fue el primer miembro de la familia de los IRSs en ser identificado. Fue descubierto en células de hepatoma mediante el uso de un anticuerpo antifosfotirosina y posteriormente también se identificó en otros tejidos como en el músculo, el corazón, el riñón, y en adipocitos [White MF et al, 1985]. Se ha comprobado que se trata de una proteína importante para la supervivencia del organismo, ya que se ha relatado que en ratones carentes de IRS-1 se produce un retardo en el crecimiento, tanto prenatal como postnatal, así como desarrollo de resistencia a la insulina y alteraciones en la tolerancia a la glucosa [Tamemoto H et al, 1994], [Araki E et al, 1994]. Por otro lado, la carencia de IRS-1 se ve reflejada en una reducción de la síntesis del ADN, aún en condiciones de estímulo con IGF-1 [Tamemoto H et al, 1994], [Araki E et al, 1994]. También se ha documentado que la carencia de IRS-1 produce una falta de la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos marrones maduros [Fasshauer M et al, 2001].

Alteraciones en la expresión celular de los IRSs se han ligado a enfermedades como la diabetes, por estar asociados a la resistencia a la insulina [White MF, 2002], [Withers DJ et al, 1998] y a tumores como el hepatocarcinoma, el cáncer de mama y el cáncer de páncreas [Chang Q et al, 2002]. A pesar de que los IRSs son proteínas que carecen de actividad enzimática intrínseca, muchos estudios han demostrado que por sí mismos son oncogénicos y pueden producir transformación tumoral. También se ha descrito que son necesarios para que numerosos oncogenes ejerzan su acción transformadora. Por el contrario, una desregulación o eliminación de los IRSs puede



alterar el proceso de transformación celular mediado por dichos oncogenes [D'Ambrosio C et al, 1995], [DeAngelis T et al, 2006].

Por otro lado, se han encontrado niveles elevados de los IRSs en muchos tumores humanos. El IRS-1, también el IRS-2, se encuentra sobreexpresado en el hepatocarcinoma debido a que se trata de un tumor en el cual hay una hiperactivación de las vías de señalización de la insulina y del IGF-1 [Nishiyama M et al, 1992] [Boissan M et al, 2005]. Además también se ha publicado que la sobreexpresión de IRS-1 bloquea la apoptosis inducida por TGF- $\beta$ 1 en líneas celulares humanas de cáncer de hígado [(A) Tanaka S et al, 1996] y que la expresión del dominante negativo del IRS-1 con el extremo c-terminal truncado revierte el fenotipo tumoral maligno en estas líneas celulares de hepatocarcinoma [(B) Tanaka S et al, 1996]. También se han



**Fig.23:** Esquema de la estructura de los IRSs. En él se reflejan las estructuras del IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4. Los círculos azules representan los residuos de regulación positiva, los rojos los de regulación negativa, y los blancos los que se desconoce el efecto de su fosforilación. Y (tirosina), S (Serina), PH (dominio de homología a pleckstrina), PTB (dominio de unión a fosfotirosina). (Adaptado de Taniguchi CM et al, 2006).

encontrado niveles elevados de IRS-1 [Bergmann U et al, 1996] y de IRS-2 en cáncer de páncreas [Kornmann M et al, 1998], y de IRS-1 en el cáncer de mama [Chang Q et al, 2002].

Por todo lo indicado anteriormente se puede afirmar que los IRSs son de vital importancia en los procesos tumorales a nivel de la transformación y tumorigénesis, y a nivel de la regulación de las vías de señalización oncogénicas implicadas en la proliferación y en la apoptosis [Cuevas EP et al, 2009].

**La Clase C** está relacionada con la respuesta al interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). El interferón- $\gamma$  es una citoquina proinflamatoria muy importante en la inmunidad innata y adaptativa implicada en la defensa contra virus, bacterias intracelulares y en el control de los tumores. Una expresión aberrante del IFN- $\gamma$  está asociada con la aparición de enfermedades autoinmunes. IFN- $\gamma$  es producido principalmente por las células “*natural killer*” (NK) y por las células “*natural killer T*” del sistema inmune como respuesta innata, así como por los linfocitos T citotóxicos CD8, una vez que se desarrolla la inmunidad contra un antígeno específico [Schoenborn et al, 2007].

La ruta de señalización del IFN- $\gamma$  se inicia con la unión del mismo a su receptor celular, el IFN- $\gamma$ R. El receptor posee dos tipos de subunidades ( $2\alpha$  y  $2\beta$ ) y la interacción del IFN- $\gamma$  con la subunidad  $\alpha$  da lugar a la dimerización del mismo. Una vez que sucede esto, el receptor se activa, recluta a la proteínas JAK1 y JAK2, y se fosforilan en residuos de tirosina de las dos subunidades  $\alpha$  intracelulares, lo que produce el reclutamiento y fosforilación de la proteína STAT1, generando homodímeros, que se traslocan al núcleo para activar los genes de respuesta a interferón [Lammas et al, 2000].

En el hepatocarcinoma, como se ha indicado anteriormente, se produce una alta expresión del gen del IGF-2 lo que da lugar a la inhibición de la apoptosis. En dicha patología se ha demostrado que los pacientes que tienen sobreexpresado los genes inducibles por IFN- $\gamma$  presentan una mayor inflamación intratumoral y destrucción de las células tumorales por apoptosis. Sin embargo, los que tienen una menor respuesta a IFN- $\gamma$  sobreexpresan IGF-2 y presentan un menor grado de apoptosis. Se observó que los niveles de IGF-2 disminuían significativamente al tratar los tumores con IFN- $\gamma$  [Breuhahn et al, 2004], lo que sugiere que el IGF-2 podría ser una diana terapéutica en este tipo de cáncer.



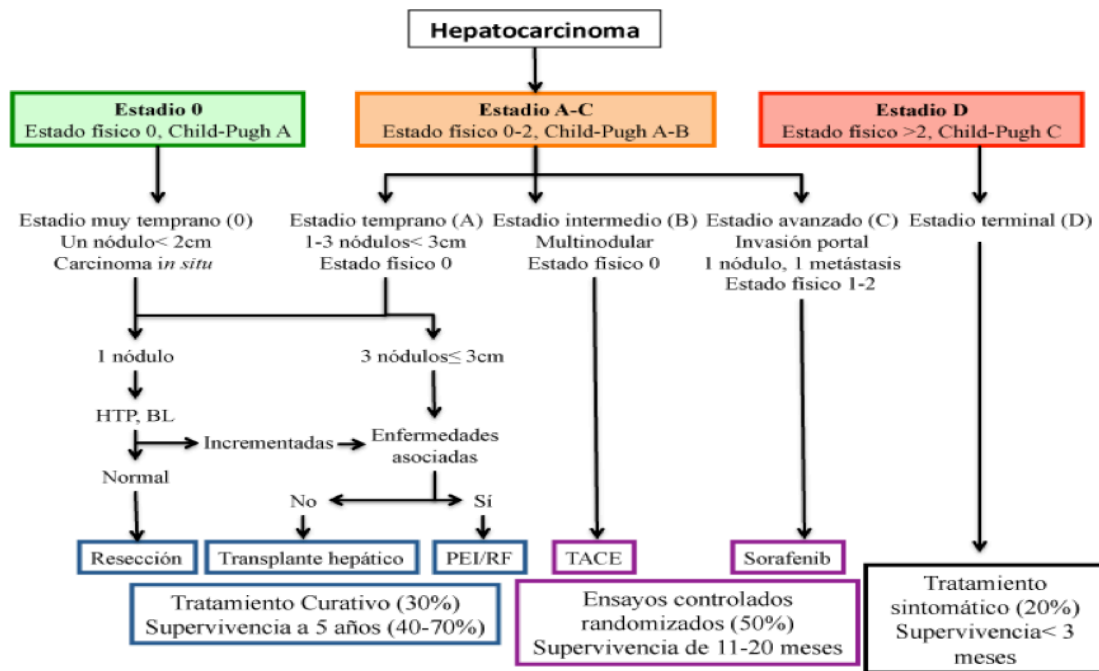
En la **Clase D** se engloban el resto de los mecanismos, como la activación de la señalización por la vía Hedgehog, cuya señalización puede estar asociada con la proliferación y supervivencia de las células cancerosas de un tumor.

La ruta de señalización de Hedgehog es fundamental en la diferenciación y regeneración celular así como en la biología de las células troncales. La sobreexpresión del gen Sonic Hedgehog se describe en el 60% de los hepatocarcinomas [(A) Llovet JM et al, 2008]. La ruta de señalización comienza con la unión del ligando de Shh (Sonic Hedgehog), Ihh (Indian Hedgehog) o Dhh (Desert Hedgehog) al receptor de membrana Ptc; esta unión hace que se active la proteína Smo, que en condiciones de ausencia de ligando estaría reprimida por acción del receptor Ptc. Esta activación de Smo induce la inhibición de los factores que fosforilarían a las proteínas Gli para su degradación; por lo tanto, estas proteínas Gli se translocarán al núcleo donde impulsarán la actividad transcripcional de los genes de Gli: Gli1 y Gli2 [Omenetti A et al, 2011]. Se han usado diferentes inhibidores de esta vía de señalización, dando como resultado una disminución del crecimiento de células de hepatoma [Sicklick JK et al, 2006].

### **I.6 Tratamiento del hepatocarcinoma**

Se ha diseñado un algoritmo para establecer el tratamiento más adecuado del hepatocarcinoma, el cual se muestra en la figura 24. Pacientes con un estadio de la enfermedad muy temprano (estadio 0) son candidatos óptimos para una resección hepática, técnica por la cual se extirpa la parte del hígado que se encuentra afectada por el tumor. Los pacientes que tengan un estadio temprano (A) serán candidatos para la realización de una terapia radical, como por ejemplo resección, trasplante hepático (procedente de un cadáver o de un donante vivo), o ablación local vía percutánea mediante inyección de etanol o mediante radiofrecuencia. Los pacientes con estadio intermedio (B) podrán ser sometidos a una terapia de quimioembolización o embolización transarterial, dependiendo si se usa o no un agente químico en la embolización. Los enfermos de estadio avanzado del hepatocarcinoma (C) serán tratados con nuevos agentes farmacológicos como es el Sorafenib, el único tratamiento por ahora eficaz que prolonga la supervivencia de los pacientes de manera significativa [(C) Llovet JM et al, 2008]. Los pacientes en estadio terminal (D) recibirán un

tratamiento paliativo que les aliviará, en parte, en los últimos momentos de su vida.



**Fig.24: Algoritmo para establecer el tratamiento más adecuado de los pacientes con hepatocarcinoma. Clasificación BCLC. HTP: Hipertensión portal; BL: Bilirrubina; PEI: Inyección percutánea de etanol; RF: Radiofrecuencia; TACE: Quimioembolización**

A continuación se describen brevemente los diferentes tratamientos utilizados en el hepatocarcinoma:

**i). Resección hepática:** Este es el tratamiento que se emplea habitualmente en los pacientes de hepatocarcinoma en estadio 0 ó A (con un sólo nódulo). En la resección hepática se lleva a cabo la extirpación de la parte del hígado que se encuentra afectada por el cáncer. Es una técnica que se utiliza en estos estadios cuando los pacientes no son cirróticos, o en cirróticos con estadio Child-Pugh A con bilirrubina normal y con ausencia de hipertensión portal. En los países occidentales, el número de pacientes



**Fig.25: Tumor hepático monodular candidato para resección (Extraído de Blum HE, 2005)**

tratados con esta cirugía para el hepatocarcinoma ronda del 5 al 10%; y en Asia se

produce en un 40% de los pacientes, ya que se realiza en los pacientes con un hepatocarcinoma más extendido. La diferencia entre continentes se debe a que en Asia la mayoría de los casos de cáncer de hígado se desarrolla a partir de una hepatitis B con ausencia de cirrosis hepática y en segundo lugar debido a la escasez de donantes de hígado, lo que hace que esta sea la única opción terapéutica [Wörns MA et al, 2010]. Desafortunadamente esta técnica es limitada y posee un alto grado de recurrencia (hasta un 70% en cinco años). Si la recurrencia es temprana, es decir antes de los dos años posteriores a la resección, se pueden adoptar diferentes estrategias como por ejemplo utilizar la técnica del TACE (quimioembolización transarterial), de la inmunoterapia con interleucina-2, con anticuerpo contra CD3, o la inyección intra-arterial de lipiodol con  $^{131}\text{I}$ . Estas medidas son eficaces, pero sin embargo no son muy recomendables como una terapia estándar en la clínica [(A) Llovet JM et al, 2008].

**ii). Trasplante hepático:** Es el tratamiento de primera elección para los pacientes con un tumor nodular de menos de 5 cm de diámetro o para pacientes con pequeños tumores multinodulares (hasta 3 nódulos de menos de 3 cm de diámetro) y sin invasión macrovascular, según se establece en el *criterio de Milan* [Mazzaferro V et al, 1996]. Con esta intervención se observa una supervivencia a 5 años del 70% y una recurrencia del 10%. Un inconveniente es la escasez de órganos disponibles, tanto procedentes de cadáveres, como de donantes vivos. También se realiza el trasplante de hígado para los tumores hepáticos de estadio 0 con hipertensión portal y bilirrubina aumentada. Para aminorar la progresión de la enfermedad durante la espera para realizar el trasplante, se aplican diferentes terapias como son la ablación percutánea por radiofrecuencia [Lu DS et al, 2005] o el TACE [Otto G et al, 2006].

**iii). Ablación local:** La ablación local es la mejor opción para tratar los tumores hepáticos que no se pueden eliminar por cirugía. Pueden ser tratados de



**Fig.26: Dispositivos de aguja de ablación por radiofrecuencias que cuentan con varios electrodos curvos retráctiles. (Extraído de <http://www.radiologyinfo.org/sp/info.cfm?pg=rfa>)**

esta manera los pacientes clasificados en el 0 ó A. En dichos pacientes, el tratamiento da como resultado una supervivencia a cinco años del 40-70% de los casos [Omata M et al, 2004], [Lencioni et al, 2005]. La ablación del tumor se puede lograr químicamente por *inyección percutánea de etanol (PEI)* o por *inyección de ácido acético*; o térmicamente por *ablación térmica por radiofrecuencia (RF)*, mediante *termoterapia por microondas*, mediante *termoterapia inducida por láser* o mediante *crioablación*.

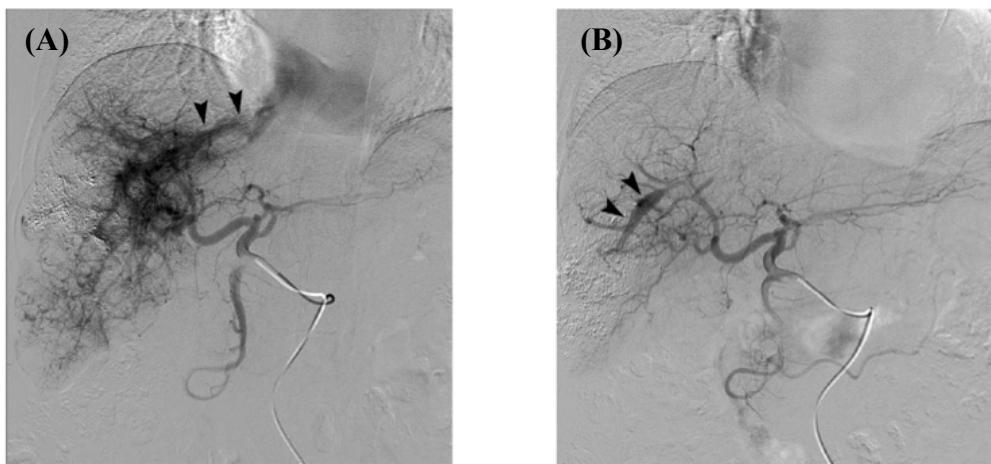
**iv). Quimioembolización transarterial (TACE):** Es el tipo de tratamiento más ampliamente utilizado cuando el hepatocarcinoma no puede ser eliminado quirúrgicamente ni por ablación local. Se suele usar en pacientes con hepatocarcinoma en estadio BCLC tipo B y con múltiples nódulos, pero está limitado a pacientes con buen estado físico, con buena funcionalidad hepática y con ausencia de trombosis en la vena porta. La quimioembolización transarterial consiste en la inyección de fármacos acompañados de una emulsión de lipiodol, a través de la arteria hepática, seguido de la administración de agentes embolizantes. La gran ventaja del TACE es que la adición de agentes quimioterápicos, seguido de la inyección de compuestos embolizantes, permite alargar el tiempo de contacto entre el fármaco y el tejido canceroso [Daniele B et al, 2009]. Los agentes quimioterápicos más utilizados para este tratamiento son la doxorubicina y el cisplatino, cuyas dosis habituales por sesión son de 10-70 mg y de 10-120 mg, respectivamente. Estas dosis dependerán de diferentes factores, como son la superficie del paciente, de su peso o el nivel de bilirrubina. Otros fármacos que han sido utilizados son la epi-doxorubicina, la mitoxantrona o la mitomicina C. Además del fármaco se introduce una emulsión de lipiodol [Nakakuma K et al, 1983], el cual es inyectado a través de la arteria hepática y puede permanecer en los nódulos tumorales durante largos períodos de tiempo [Okayasu I et al, 1988]. Otros agentes embolizantes que se pueden añadir son *Gelfoam (esponja de gelatina)* y partículas/microesferas de *polivinilalcohol*, siendo el *Gelfoam* el más utilizado. Cuando son introducidos intravascularmente pueden bloquear la arteria hepática de manera que disminuya la irrigación del tumor [Kan Z et al, 1993].

Recientemente la técnica del TACE se ha mejorado gracias al desarrollo de las microesferas de elución de fármacos. Gracias a estas microesferas se libera el fármaco de una manera más controlada y sostenida en el lugar de acción y no se pierde tanto en el sistema vascular [Malagari K et al, 2011], [Namur J et al, 2011]. El uso de éstas

estructuras podría mejorar los resultados de la técnica en cuanto a la eficacia del tratamiento, desde un 44% en el caso de TACE convencional hasta un 52% en el caso del uso de microesferas de elución de fármacos [Lammer J et al, 2010].

El tratamiento por TACE hace que las células cancerosas mueran por necrosis y que disminuya el tamaño del tumor, lo que se correlaciona con la disminución de los marcadores tumorales, obteniéndose hasta un 61% de respuesta a la terapia; pero, por desgracia, los pacientes tratados con TACE no aumentan su esperanza de vida significativamente e incluso mueren (70-80%) durante el periodo de seguimiento de la terapia debido a las recidivas que se producen después de la recuperación del flujo arterial hepático.

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento combinado de TACE y RF mejora los resultados de los dos tratamientos por separado, produciendo una mayor respuesta en los pacientes así como una supervivencia media mejor [Cheng BQ et al, 2008].

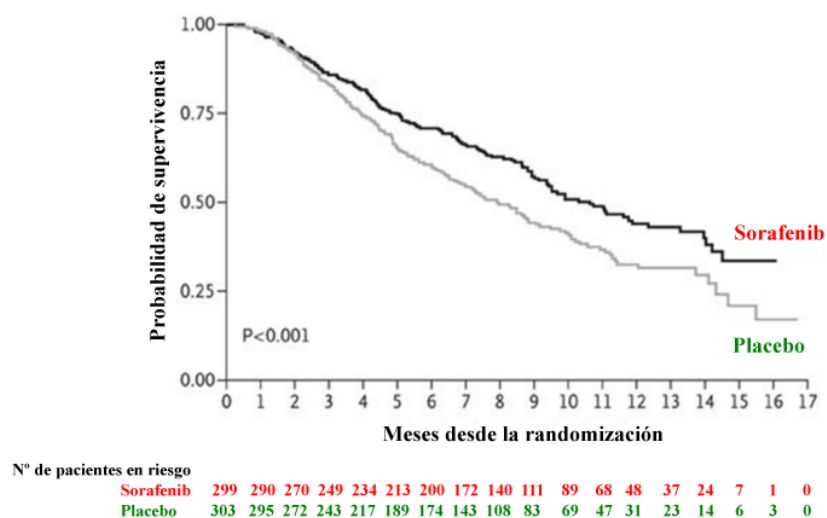


**Fig.27: (A) Paciente con hepatocarcinoma en el momento de ser tratado con TACE usando una mezcla de lipiodol (15mL)+doxorrubicina (50mg) y gelfoam. (B) El mismo paciente después de 5 meses de tratamiento; se ve que ha desaparecido la vascularización tumoral (Extraído de Shin SW et al, 2009)**

v). **Tratamientos sistémicos:** Los tratamientos sistémicos son los tratamientos que se usan en pacientes con hepatocarcinoma en estadio avanzado (BCLC C), donde existe invasión portal por parte del tumor, hay metástasis, y el paciente tiene un estado físico de hasta nivel 2. Durante décadas el tratamiento de pacientes con hepatocarcinoma avanzado no ha dado buenos resultados. Sin embargo,

el conocimiento de las causas moleculares de la hepatocarcinogénesis ha avanzado considerablemente y está empezando a dar resultados prometedores [(A) Llovet JM et al, 2008]. Diversas vías de señalización celular han sido identificadas repetidamente como importantes en la proliferación y en la angiogénesis; algunas de ellas ya han sido citadas previamente, como por ejemplo: Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK), PI3K/AKT/mTOR, Wnt/ $\beta$ -Catenina, o Hedgehog. A continuación se describen algunas terapias para el tratamiento del cáncer de hígado en diferentes fases clínicas.

El fármaco que ha demostrado mayor eficacia en el tratamiento de enfermos con cáncer avanzado de hígado ha sido el Sorafenib. Es un inhibidor multiquinasa (Raf-1, B-Raf, VEGFR2, PDGFR, receptores c-kit, entre otras dianas) [Wilhelm S et al, 2006] y fue aprobado por la EMEA (*European Medicines Agency*) y por la FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), porque aumenta la supervivencia media de los pacientes en relación al placebo.



**Fig.28: El Sorafenib aumenta de manera significativa la supervivencia de los pacientes con hepatocarcinoma (Extraído y modificado de (C) Llovet et al, 2008)**

De momento el Sorafenib es el único fármaco que está aprobado para el tratamiento del hepatocarcinoma pero hay otras moléculas que se encuentran en las diferentes fases de desarrollo clínico. Estas moléculas en desarrollo se clasifican en la Figura 29 por el tipo de diana celular sobre la que actúan:

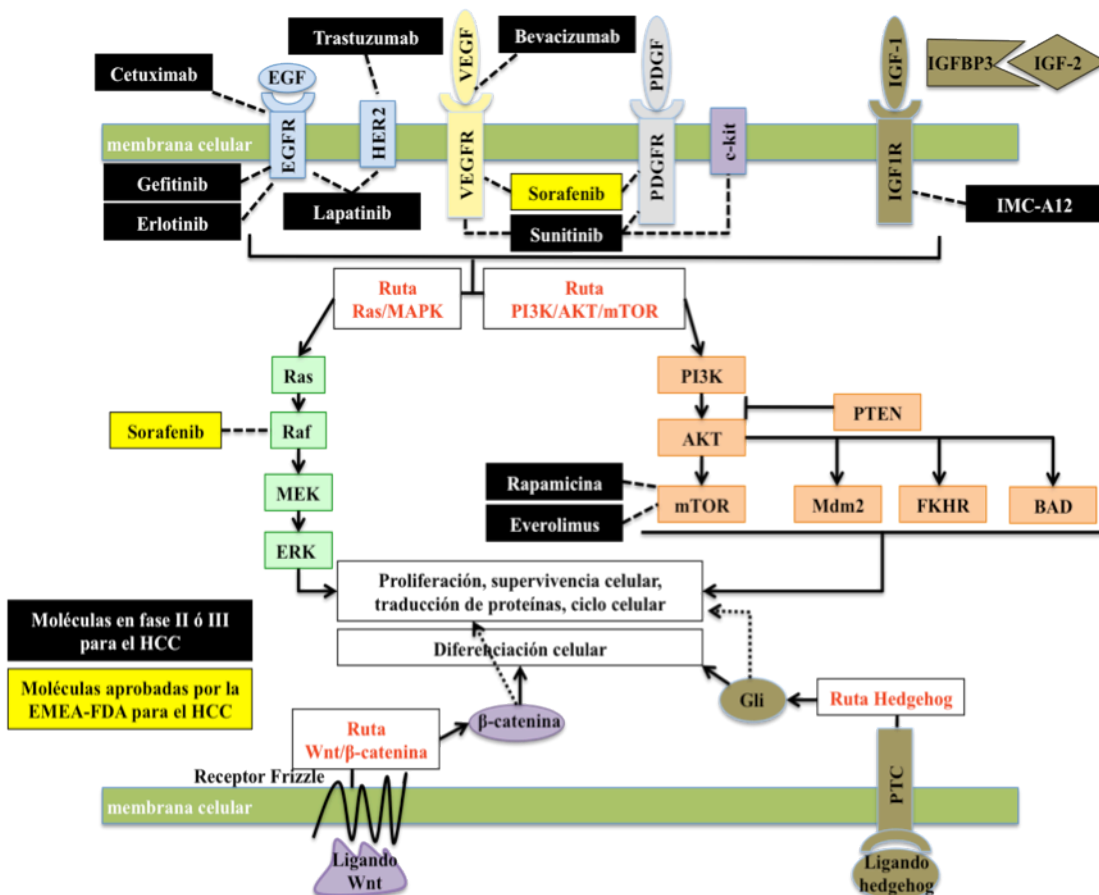


FUNCIÓN CELULAR	PROTEÍNA DIANA	MOLÉCULA (tipo)
Transducción de la señal	<b>Receptores de factores de crecimiento</b>	
	EGFR	Gefitinib (ITQ), Erlotinib (ITQ), Cetuximab (Am), Panitumumab (Am)
	HER2	Transtuzumab (Am), Lapatinib (ITQ)
	PDGFR	Imatinib (ITQ), Sunitinib (ITQ), Sorafenib (ITQ)
	FLT3	Lestaurtinib (ITQ), PKC-412 (ITQ), Sunitinib (ITQ)
	IGF1R	IMC-A12 (Am)
	c-met	SU11274 (ITQ), JNJ-38877605 (ITQ), ARQ197 (ITQ)
	c-kit	Imatinib (ITQ), Dasatinib (ITQ)
	<b>Señal intracelular</b>	
	Ras	Tipifarnib (IFT)
	Raf	Sorafenib (ISTQ)
	MEK	Vandetanib (ITQ), AZD6244
	PI3K	XL-765 (ISTQ)
mTOR	Temsirolimus, Everolimus (ISTQ), Rapamicina (ISTQ)	
<b>Angiogénesis</b>	<b>Factores de crecimiento</b>	
	VEGF	Bevacizumab (Am)
	<b>Receptores de factores de crecimiento</b>	
	VEGFR (1-3)	Sorafenib (ITQ), Sunitinib (ITQ), Brivanib, Cediranib, Valatanib, IMC1121B (Am)
	PDGFR	Sorafenib (ITQ), Imatinib (ITQ), Sunitinib (ITQ)
<b>Apoptosis</b>	<b>Vía intrínseca</b>	
	BCL2	GX15-070, Oblimersen
	<b>Vía extrínseca</b>	
	Apo2L/TRAIL	Mapatumumab, Apomab, AMG-655, rhApo/TRAIL
<b>Renovación de proteínas</b>	Proteosoma	Bortezomib
<b>Reorganización de la cromatina</b>	HDAC (enzima histona desacetilasa)	SAHA
	ADN metiltransferasa	Decitabine
<b>Ciclo celular</b>	CDKs	Flavopiridol (ICDK)
<b>Migración e invasión</b>	SRC	Dasatinib, XL228

**Fig.29: Resumen de las diferentes moléculas que están siendo evaluadas clínicamente para el tratamiento del hepatocarcinoma. ITQ: inhibidor de tirosin-quinasa; Am: anticuerpo monoclonal; IFT: inhibidor de farnesil transferasa; ISTQ: inhibidor de serin/treonin quinastas; ICDK: inhibidor de quinastas dependientes de ciclina. (Modificado de (A) Llovet JM et al, 2008)**

También se están estudiando combinaciones de varias moléculas, pero de momento no se han producido resultados realmente positivos. Actualmente, se continúa con la investigación a nivel básico para localizar nuevas dianas terapéuticas, que permitan el desarrollo de nuevos medicamentos.

En la figura 30 podemos apreciar las moléculas que están en fase clínica, junto con la diana celular con la que interaccionan.



**Fig.30: Esquema de las diferentes moléculas en fase clínica para el tratamiento del hepatocarcinoma (Modificado de (A) Llovet JM et al, 2008)**



## II. AZATIOPRINA

### II.1. Historia

La azatioprina se sintetizó por primera vez a finales de los años cincuenta por la bioquímica y farmacóloga estadounidense Gertrude Belle Elion como resultado de la búsqueda de análogos de la molécula 6-mercaptopurina (6-MP). Se introdujo un grupo imidazol en la molécula de purina con el objetivo de mejorar su biodisponibilidad y hacer que se libere más lentamente la 6-MP.

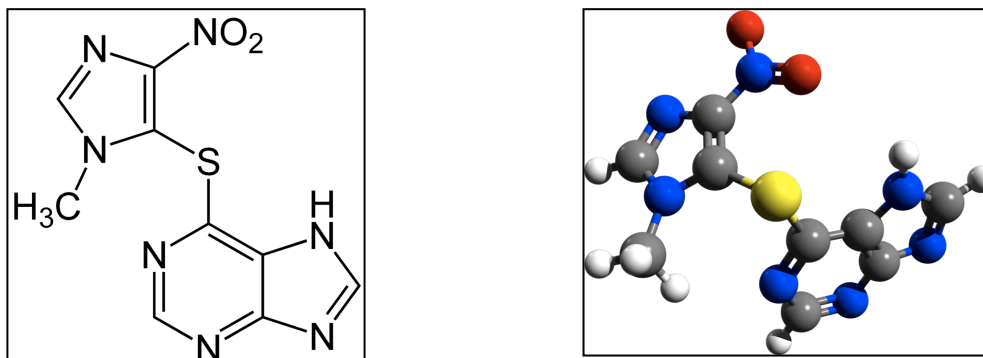
En 1962 fue introducida en la clínica por Sir Roy Calne, cirujano británico, que estudió las bases inmunológicas del rechazo de los trasplantes. En un principio utilizó la 6-mercaptopurina como inmunosupresor para trasplante de riñón y de corazón, pero cuando se descubrió la azatioprina se empezó a utilizar en los trasplantes por resultar menos tóxica que la 6-MP. Fue la primera molécula que mostró eficacia como inmunosupresor en los trasplantes de riñón, corazón e hígado.

Aunque es un fármaco con muchos años de historia hay que destacar que no está en desuso, ya que se utiliza en numerosas enfermedades para las que no estaba indicado inicialmente. Además se sigue investigando sobre la azatioprina, tanto desde el punto de vista clínico como básico, como lo prueba el hecho de que hay más de 18689 citas en PubMed, de las que 573 pertenecen al año 2012. Por otro lado el número de ensayos clínicos que se están realizando con el fármaco asciende a 149 en todo el mundo, habiendo en España 7 ensayos clínicos activos.

### II.2. Estructura y propiedades químicas

La azatioprina (6-[1-metil-4-nitro-imidazol-5-il]-sulfanil-7H-purina) es un profármaco y como se ha dicho anteriormente, fue sintetizado por Elion trabajando en el laboratorio de Hitchings. Hoy en día, se produce en diferentes empresas farmacéuticas adoptando diversos nombres comerciales: *Azasan* (Salix), *Imuran* (GlaxoSmithKline en Canadá, EEUU, Australia y Reino Unido), *Imurel* (GlaxoSmithKline en Escandinavia y Francia) y *Azamun* (GlaxoSmithKline en Finlandia). [\[http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2265\]](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=2265),

[<http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/search.cfm?startswith=AZATHIOPRINE&x=5&y=16>].



**Fig.31: Estructura de la Azatioprina (CAS 446-86-6)**

Se trata de un compuesto sólido de color amarillo pálido y estable en condiciones normales de presión y temperatura, con un peso molecular de 277.3 g/mol. Es insoluble en agua y muy poco soluble en etanol y cloroformo; sin embargo, es perfectamente soluble en dimetilsulfóxido (DMSO), dando disoluciones amarillas que no se conservan muy bien. Es sensible a la oxidación y se descompone en disoluciones alcalinas fuertes. Su punto de fusión es 244°C y cuando se calienta a descomposición emite vapores tóxicos de óxido de nitrógeno y de óxido de azufre. [<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/f?./temp/~1lyzsv:1>], [IARC Working Group, 2011].

### II.3. Indicaciones terapéuticas

La azatioprina forma parte de la familia de las tiopurinas junto con la 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina.

Tienen diferentes aplicaciones clínicas que se pueden dividir en dos categorías: anticancerosos e inmunosupresores:

i). Como anticancerosos: la 6-MP fue utilizada desde el principio en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, el cáncer infantil más común, y contribuyó desde el primer momento a un aumento significativo de la supervivencia de los niños con esta enfermedad [Burchenal JH et al, 1953]. Hoy en día gracias a la quimioterapia se curan más del 80% de los pacientes [Pieters R, 2010]. En la mayoría

de los protocolos utilizados se sigue incluyendo el uso de la 6-MP. La 6-TG se utiliza en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda y crónica.

ii). Como inmunosupresores: por sus propiedades inmunosupresoras las tiopurinas han sido utilizadas en el tratamiento de un gran número de enfermedades inflamatorias crónicas y autoinmunes.

Algunos usos de las tiopurinas se detallan a continuación. La azatioprina posee diferentes aplicaciones en su uso clínico. Es comúnmente utilizada como antimetabolito inmunosupresor sólo o en combinación con otros agentes, habitualmente con corticosteroides. En combinación con corticosteroides y/u otros fármacos está indicado para evitar el rechazo en el trasplante renal, cardíaco y hepático. También se usa solo o en combinación con otros fármacos en el tratamiento de diferentes patologías como [Parfitt K, 1999]:

i). **Desórdenes de la sangre, no malignos:** se usa en enfermedades como la anemia hemolítica autoinmune y la púrpura trombocitopénica idiopática.

ii). **Desórdenes del tejido conectivo y del tejido muscular:** se usa en el control de enfermedades como el síndrome de Behçet y en la polimiositis.

iii). **Desórdenes hepáticos, no malignos:** se usa en la remisión mantenida de la hepatitis autoinmune crónica y en la ralentización de la progresión de la cirrosis biliar primaria.

iv). **Desórdenes pulmonares, no malignos:** se usa en el tratamiento de la enfermedad intersticial del pulmón.

v). **Desórdenes neuromusculares:** se usa en el tratamiento de la miastenia gravis y de la esclerosis múltiple.

vi). **Desórdenes oculares, no malignos:** se usa en el tratamiento de varios desórdenes oculares como pueden ser la escleritis o la uveítis.

vii). **Artritis psoriásica:** se usa en estadios severos de esta enfermedad.

viii). **Artritis reumatoide:** se usa en estadios severos de la enfermedad cuando el enfermo no responde a otros tratamientos

ix). **Enfermedad inflamatoria intestinal:** se usa tanto en el Síndrome de Crohn como en la colitis ulcerosa refractaria. Su uso está indicado tanto en la inducción como en el mantenimiento de la remisión de la enfermedad.

x). **Sarcoidosis:** se usa en el tratamiento de esta dolencia cuando los pacientes no

responden o no toleran el tratamiento con corticosteroides.

xi). **Desórdenes de la piel, no malignos:** como otros inmunosupresores, la azatioprina se ha probado en el tratamiento de desórdenes refractarios de la piel como el pénfigo vulgar, el eccema atópico o dermatitis, el prurigo nodular, el pioderma gangrenoso, el eritema multiforme y en el lupus eritematoso.

xii). **Síndromes vasculíticos:** la azatioprina se usa en numerosos síndromes vasculíticos como son la arteritis temporal, la poliarteritis microscópica, el síndrome de Churg-Strauss o granulomatosis alérgica, y la granulomatosis de Wegener.

#### II.4. Posología

La dosis de azatioprina utilizada depende de las condiciones del paciente y de la enfermedad a tratar. En el trasplante de órganos, dependiendo del régimen inmunosupresor, se suele utilizar una dosis de 5 mg/kg/día por vía intravenosa u oral, y posteriormente se ajusta la dosificación en un rango de entre 1 y 4 mg/kg/día por vía oral, dependiendo de las necesidades clínicas y de la tolerancia hematológica. Cuando la enfermedad a tratar es del tipo inflamatorio, la dosis efectiva es de 2 a 3 mg/kg/día. Si se trata de la esclerosis múltiple, la posología habitual es de 2.5 mg/kg/día. Para otras enfermedades la dosificación de la azatioprina es muy similar a las mencionadas [Sanz J, 2005].

#### II.5. Interacciones y efectos adversos

Como todos los fármacos inmunosupresores, la azatioprina presenta interacciones con otros medicamentos y además efectos adversos. Mostrará interacciones con el uso de otros fármacos como el alopurinol, el oxipurinol y el tiopurinol porque estos inhiben la enzima *xantina oxidasa* y por lo tanto, aumentan la actividad de la azatioprina al no poder degradarse a ácido tiúrico, producto inactivo que se excreta en las heces y en la orina. También se observan interacciones medicamentosas de la azatioprina con bloqueantes neuromusculares como succinilcolina y con la tubocurarina, ya que la azatioprina potencia el efecto bloqueante de los mismos. La azatioprina también inhibe el efecto anticoagulante de la warfarina. Además presenta interacciones con fármacos citoestáticos y mielosupresores, como la penicilamina, potenciando sus efectos [Sanz J,

2005].

Los efectos adversos que se han registrado derivados del uso de la azatioprina son los siguientes: depresión de la médula ósea, aumento de infecciones virales, bacterianas y micóticas, diarrea grave, pancreatitis, enfermedad venooclusiva hepática, hepatotoxicidad y neumonitis [Sanz J, 2005], [Sherlock S, 1986].

## II.6. Farmacocinética

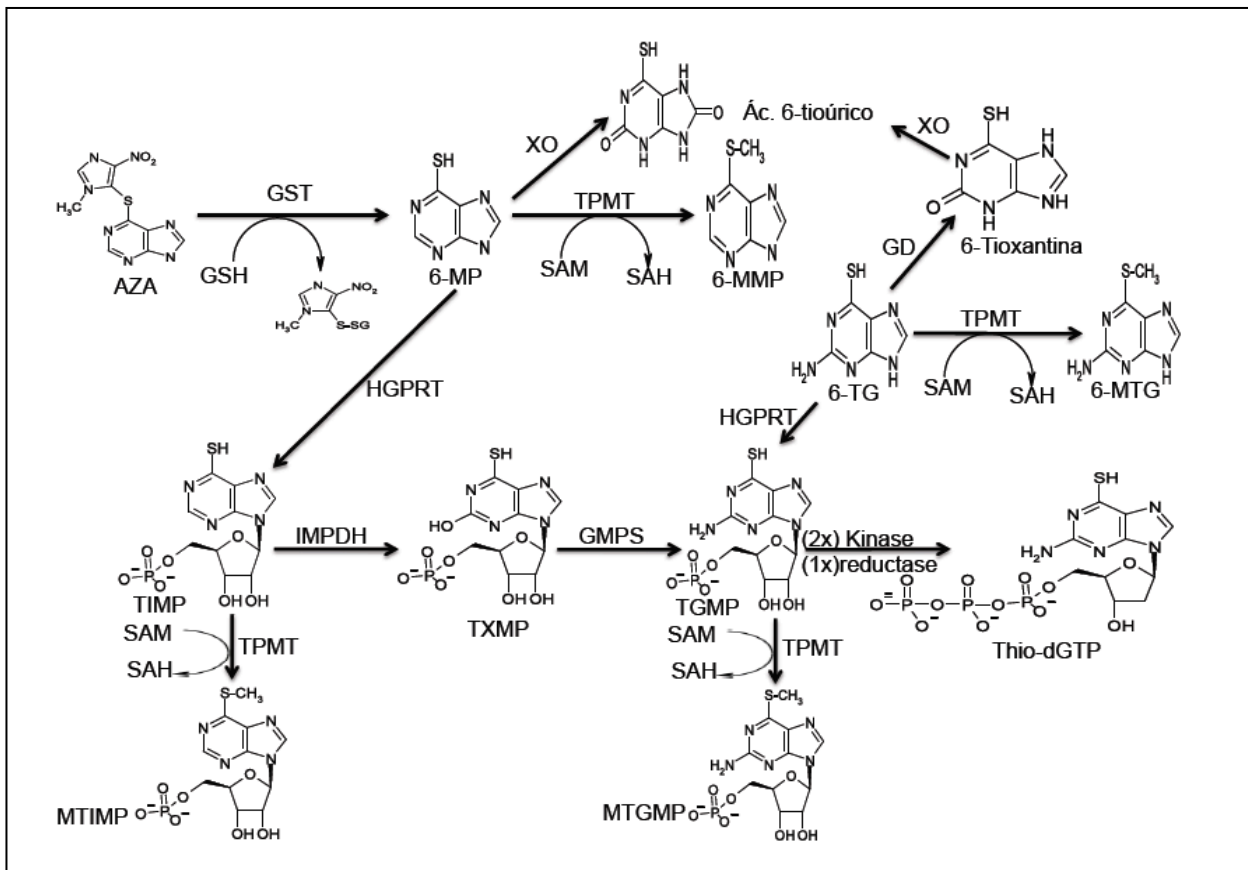
La azatioprina presenta una buena absorción en tracto gastrointestinal alto, cuando se administra por vía oral, aunque es recomendable administrarla durante las comidas para evitar molestias gastrointestinales. El estudio de su biodisponibilidad no tiene utilidad clínica, puesto que sus efectos no se correlacionan con los niveles plasmáticos, sino con los tisulares. En cuanto a su distribución, estudios en ratones con <sup>35</sup>S-azatioprina no mostraron acumulación inusual en ningún tejido en particular, aunque se detectó escaso marcaje con <sup>35</sup>S en cerebro. Los nucleótidos que se forman en las células durante el metabolismo de la azatioprina no atraviesan las membranas celulares y por lo tanto quedan secuestrados en su interior, no circulando por los fluidos del organismo. Por otra parte, la azatioprina atraviesa la barrera placentaria y se ha detectado en la leche de madres lactantes. Tanto la azatioprina como su metabolito 6-mercaptopurina se unen a proteínas plasmáticas.

El profármaco azatioprina se metaboliza de la siguiente manera: la primera reacción que sufre es la reducción del azufre por acción del *glutation* (GSH) y de la enzima *glutation-S-transferasa* (GST). La reacción se produce por un mecanismo de adición-eliminación, gracias a que el grupo nitro del imidazol se comporta como un aceptor de Michael. El ataque al carbono 5 del anillo imidazólico por el azufre del glutatión genera la excisión del enlace C-S dando lugar a 6-mercaptopurina (6-MP) y al metabolito 5-glutationil-1-metil-4 nitroimidazol [Crawford DJ et al, 1996]. La 6-mercaptopurina puede ser metabolizada por tres vías diferentes.

i). La primera vía es la inactivación por la acción de la enzima *xantina oxidasa* dando el metabolito ácido 6-tioúrico, que es el compuesto que excreta el organismo como resultado de la metabolización de la azatioprina y de la 6-mercaptopurina.

ii). La segunda vía es la metilación del grupo tiol, donde entra en juego la S-adenosilmetionina (SAM) y está catalizada por la enzima *tiopurina-S-metiltransferasa* (TPMT). El producto de dicha reacción, la 6-metilmercaptopurina, tiene poca actividad farmacológica por lo que esta enzima es clave en la respuesta del paciente al tratamiento con azatioprina. A menor actividad de esta, habrá menos capacidad detoxificadora y por lo tanto un mayor riesgo de mielosupresión [Cara CJ et al, 2004]. De hecho, la actividad de la enzima TPMT es un parámetro que se estudia al iniciar el tratamiento con el fármaco [Menor C et al, 2002], [Weinshilboum RM et al, 1980].

iii). La tercera vía es la conversión por la enzima *hipoxantina-guanosina-fosforribosiltransferasa* (HGPRT) en nucleótidos de 6-MP [Elion GB, 1989]. Estos se transformarán, por la acción de la *inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa* (IMPDH), en



**Fig.32: Esquema de la metabolización de la azatioprina. (Adaptado de [Karran P et al, 2008], [Derijks LJ et al, 2010])**

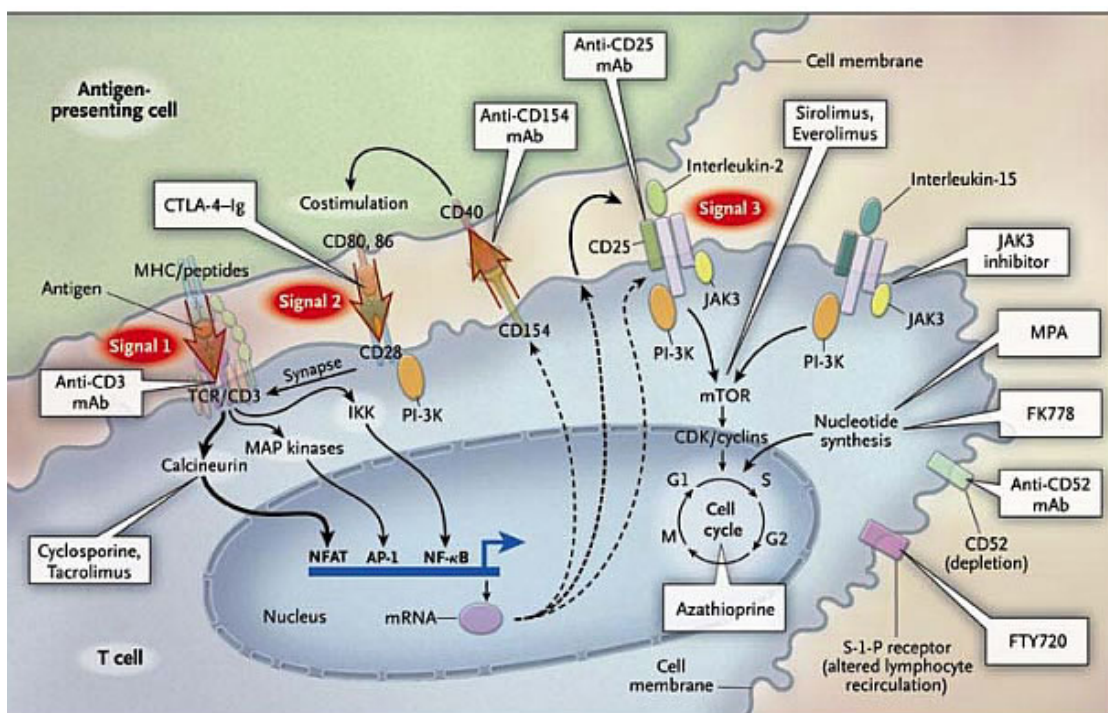
nucleótidos de 6-tioxantina (TXMP), que posteriormente se convertirán en nucleótidos de 6-tioguanina (6-TGN), por la *guanosina monofosfato sintetasa* (GMPS), los cuales se incorporarán al ADN y ARN ejerciendo su acción farmacológica.

La eliminación del medicamento se realiza principalmente por orina, en forma de 6-tioúrico. Su determinación es una buena herramienta en la monitorización de los pacientes a los que se les administra azatioprina o 6-mercaptopurina.

El esquema de la metabolización de la azatioprina se presenta en la figura 32.

## II.7. Farmacodinamia

A pesar de ser una molécula con una larga trayectoria no está claro todavía su mecanismo de acción terapéutica y de toxicidad. Hasta hace poco se pensaba que la acción citotóxica de AZA/6-MP se debía a su incorporación al pool de nucleótidos de 6-tioguanina (6-TGNs), los cuales a su vez se introducían en el ADN y en el ARN como nucleótidos anómalos, bloqueando la transcripción [Snow JL et al, 1995]. Sin embargo

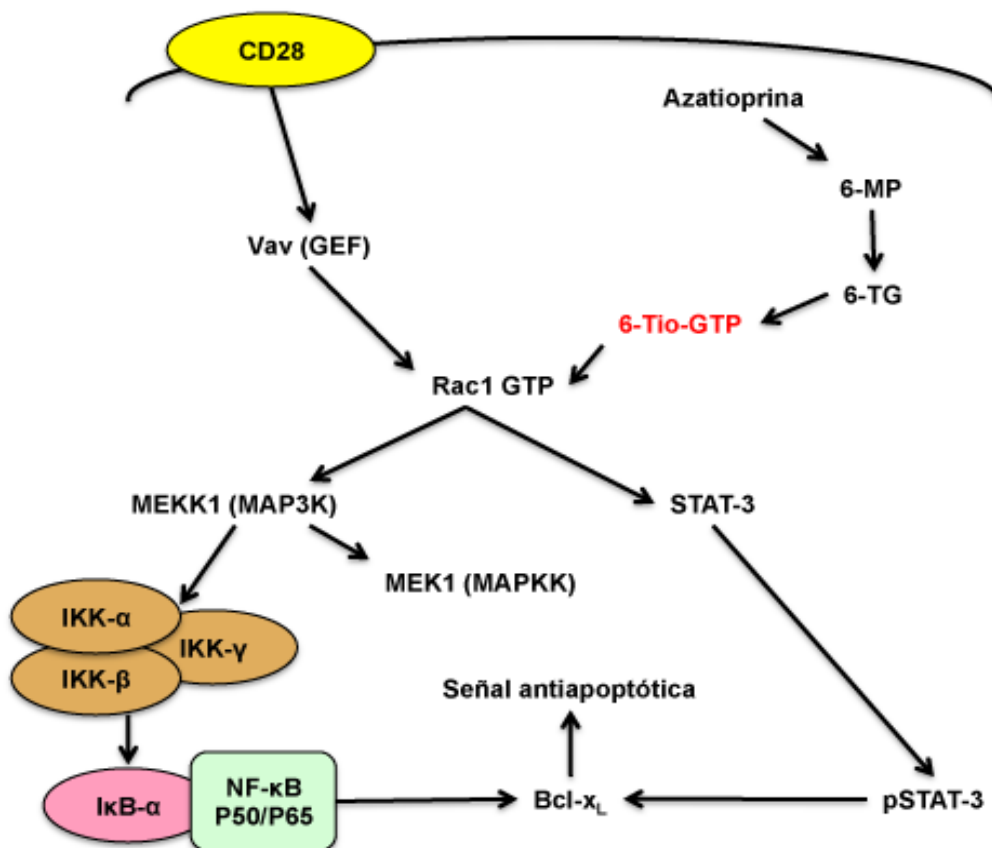


**Fig.33: Dianas terapéuticas en la célula T para los diferentes inmunosupresores utilizados actualmente (Extraído de Halloran PF, 2004)**



recientemente se han demostrado nuevos mecanismos de acción para la azatioprina.

Los linfocitos juegan un papel fundamental en las enfermedades autoinmunes y en el rechazo del órgano trasplantado. En la figura 33 se muestran diversas dianas para regular la actividad de los linfocitos T. Uno de los posibles mecanismos de acción de la azatioprina pudiera ser a través de la inhibición de señales estimuladoras para los linfocitos. Para que los linfocitos T se activen hacen falta dos señales: la primera de las señales es a través del receptor de células T (TCR) y la segunda señal es una señal co-estimuladora. Esta segunda señal es necesaria porque su falta puede causar anergia y apoptosis de la célula T [Rathmell JC et al, 2002]. La co-estimulación se produce a través de una proteína transmembrana conocida como CD28 cuya activación da lugar a la activación de la proteína Rac1, que a su vez estimula las cascadas de MEK y de STAT3 produciendo una señal antiapoptótica para la célula T en forma de aumento de los niveles de Bcl-x<sub>L</sub>. Cuando se tratan los linfocitos T con azatioprina se produce el



**Fig.34: Modelo de la inmunosupresión mediada por Azatioprina. (Adaptado de Tiede I et al, 2003)**



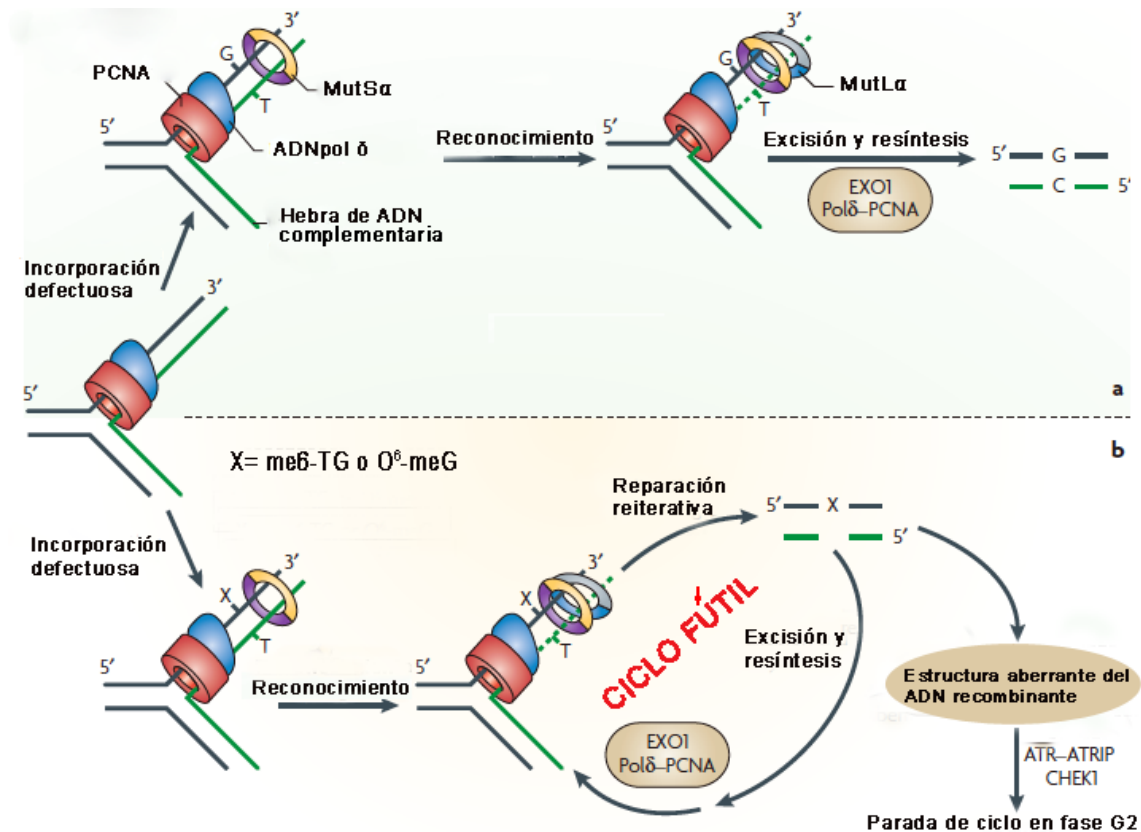
bloqueo de la proteína Rac1 por unión a la misma del metabolito de la azatioprina, 6-TioGTP, lo que da lugar a la apoptosis de la célula T [Tiede I et al, 2003] (figura 34).

A parte de los mecanismos citados las tiopurinas inducen citotoxicidad principalmente por medio de otros dos mecanismos: el llamado “DNA mismatch repair” (reparación del ADN mal apareado) y a través de la inhibición de la ruta de biosíntesis de purinas.

i). Reparación del ADN mal apareado (MMR): Es un proceso ampliamente extendido en la mayoría de los sistemas celulares procariotas y eucariotas. El MMR es un sistema de reparación del ADN por el cual la célula repara las mutaciones. Cuando el ADN se replica en el núcleo de la célula, las enzimas polimerasas del ADN cometen errores en la replicación, lo que podría dar lugar a mutaciones. Para reparar estos errores existen otras enzimas, conocidas como “mismatch repair enzymes”, cuya función es reconocerlos y repararlos. Después de la replicación, las enzimas reparadoras se trasladan por las nuevas moléculas de ADN identificando aquellas parejas de bases que están mal apareadas. Cuando identifican un error, el complejo MMR recluta otras enzimas que se encargarán de completar la reparación del ADN. Primeramente, una enzima endonucleasa corta el enlace fosfodiéster entre la ribosa y el fosfato, en el punto donde está el error, posteriormente la enzima exonucleasa retira la base defectuosa dejando un hueco en la hebra de la doble hélice que será reemplazado con la base correcta por la acción de la enzima ADN polimerasa reparadora. Finalmente, la enzima ligasa formará los nuevos enlaces fosfodiéster completando la reparación del ADN. En humanos se conocen dos complejos enzimáticos para llevar a cabo esta función: hMLH1 (mutL homolog 1) y hMSH2 (mutS homolog 2).

Como se ha mostrado en la figura 32, el metabolismo de la 6-MP y de la 6-TG puede dar lugar a un producto activo conocido como 2'-deoxi-6-tioguanosina 5'-trifosfato (6-tio-dGTP), el cual al ser un buen sustrato de la ADN polimerasa puede ser incorporado al ADN [Ling YH et al, 1991], ya que posee una  $K_m$  similar a la dGTP. La toxicidad de las tiopurinas es de efecto tardío porque requiere pasar a través de una fase S del ciclo celular, para que se incorpore la 6-tio-dGTP al ADN, y una segunda fase S, que permita la replicación del ADN que incorporó la tiopurina [Yan T et al, 2003]. Los restos de tiopurina pueden ser metilados en el ADN para dar meG, los cuales cuando se

vuelva a dar una nueva ronda de replicación hibridan con timina, apareciendo puntos de ADN mal apareado que son reconocidos por el sistema MMR. Dicho sistema se activa eliminando una pequeña región de la hebra hija donde se encontraba la timina. Sin embargo, cuando vuelve a actuar la ADN polimerasa sitúa de nuevo timina enfrente de la meG, esto da lugar a un ciclo fútil que desencadena la activación del complejo “ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related)-ATRIP (ATR-interacting proteína) DNA-damaged signalling”, fosforilación de CHEK1, parada de ciclo celular en la fase G2 (figura 35) y apoptosis. Un mecanismo similar a éste se produce con los compuestos metilantes del ADN. Si el mecanismo de MMR no es funcional no se produce la citotoxicidad, aunque se acumulan las mutaciones.



**Fig.35: Imagen del sistema MMR en eucariotas sin incorporación (a) y con incorporación de me<sup>6</sup>-TG (b) (imagen modificada de [Karran P et al, 2008])**

ii). Biosíntesis de purinas: Algunas evidencias sugieren que la capacidad de la 6-MP y sus metabolitos para inhibir la biosíntesis de purinas *de novo* podría contribuir a sus efectos citotóxicos. La enzima TPMT es capaz de metilar, como se mostraba en la

figura 32, a la TIMP dando como resultado MTIMP (metiltioinosítido monofosfato), que es un eficiente inhibidor de la enzima fosforibosil-pirofosfato aminotransferasa (PPAT), la cual cataliza uno de los primeros pasos de la ruta de biosíntesis de purinas [Tay BS et al, 1969] así como de la enzima IMPDH, la cual está implicada en la biosíntesis de GTP [Cara CJ et al, 2004]. Por lo tanto, de aquí se deduce que al inhibir esta ruta de biosíntesis de purinas disminuirán los niveles de los nucleótidos de purina trifosfato, necesarios para la síntesis del ADN y del ARN, así como en el metabolismo y la señalización celular.





Universidad  
de Alcalá

# *HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*

---

---

*“Les encanta descubrir. Si consigues  
mantener esa curiosidad y que se den cuenta  
de lo que se trata en realidad, entonces se  
dirigirán hacia la ciencia”*

**Gertrude Bell Elion**



El cáncer de hígado es un síndrome muy heterogéneo por su etiología y por sus características moleculares. Sin embargo casi todos sus tipos tienen en común su gran agresividad y su resistencia a las terapias actuales, incluido el tratamiento farmacológico sistémico. Recientemente se han publicado resultados esperanzadores con un inhibidor de MAPKs (Sorafenib) el cual prolonga ligeramente la supervivencia de pacientes con hepatocarcinoma en estadios avanzados. Es por ello que sigue siendo una necesidad clínica el desarrollo de nuevas moléculas o de nuevas combinaciones de fármacos que demuestren eficacia en el tratamiento de cualquier tipo de cáncer de hígado.

En esta tesis doctoral se evalúa el efecto terapéutico de la azatioprina en combinación con otras moléculas en diferentes modelos experimentales de cáncer de hígado. Datos previos de nuestro grupo de investigación demostraban que la azatioprina provocaba muerte celular por necrosis de hepatocitos de rata en cultivo [Menor C et al, 2004]. Por ello decidimos estudiar el efecto de la azatioprina sobre la supervivencia de líneas celulares de cáncer de hígado y de colon, que tenían en común su gran resistencia a fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer. La eficacia de la azatioprina se evaluó tanto *in vitro*, en diferentes líneas en cultivo, como *in vivo*, utilizando un modelo de xenotransplante de células tumorales en ratones inmunodeprimidos y que por lo tanto desarrollan un tumor sólido.

Las líneas celulares utilizadas proceden de hepatoblastomas (HepG2 y HuH6), de hepatocarcinomas (HuH7 y Hep3B), de hepatocitos humanos inmortalizados (Chang Liver) y hepatocitos inmortalizados de ratones neonatos. Se comparan los resultados con líneas celulares de cáncer de colon (RKO, SW-48, SW-480 y LoVo).

El modelo *in vivo* se realiza mediante la inyección subcutánea de células HepG2 en ratones atímicos.

Los objetivos concretos de estudio son:

1. Evaluar la eficacia de la azatioprina y de sus análogos (6-mercaptopurina y 6-tioguanina) sobre diferentes procesos celulares (autofagia, muerte celular y división celular) que repercuten en el desarrollo tumoral.
2. Estudiar el mecanismo de acción de la azatioprina y de sus análogos (6-mercaptopurina y 6-tioguanina) sobre diferentes vías de señalización que



controlan los procesos anteriores.

3. Estudiar la posible sinergia de la azatioprina con otras moléculas (bafilomicina A1 y butionina sulfoximina) para el tratamiento del cáncer de hígado.





Universidad  
de Alcalá

# *CAPÍTULO I*

---

---

*“Si buscas resultados no hagas  
siempre lo mismo”*  
**Albert Einstein**



## CAPÍTULO I

### **CARACTERIZACIÓN DE LA AUTOFAGIA INDUCIDA POR TIOPURINAS EN CÉLULAS HEPG2. ESTUDIO DEL EFECTO SOBRE LA MUERTE CELULAR.**

#### **Justificación del trabajo:**

En este primer capítulo de la tesis doctoral se van a exponer los efectos que provoca la azatioprina sobre la autofagia, utilizando como modelo experimental la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2. Los efectos de la azatioprina se comparan con los de la 6-tioguanina [Zeng X et al, 2007] [Zeng X et al, 2008]. Dichas células proceden de un hepatoblastoma de un joven de 15 años de raza caucasiana.

La autofagia es un proceso celular catabólico que está fuertemente regulado por hormonas. En las células normales es utilizado para obtener la energía metabólica que le permita sobrevivir en condiciones de ayuno. En esta situación, la hormona más importante que regula la autofagia hepática es el glucagón. En condiciones anabólicas, es decir cuando la célula recibe un gran aporte energético en forma de nutrientes, se inhibe la autofagia gracias a la acción de hormonas como la insulina o el IGF-1.

Hay otros factores que activan la autofagia como por ejemplo la infección por agentes patógenos, la activación del estrés oxidativo, la exposición a tóxicos del ambiente y/o a fármacos, entre otros muchos factores.

#### **Hipótesis y objetivos concretos:**

En este sentido nos hemos planteado estudiar el efecto de la azatioprina sobre la autofagia en células tumorales HepG2, así como comparar su efecto con otras tiopurinas. En segundo lugar hemos estudiado el efecto de la azatioprina en combinación con la bafilomicina A1 sobre la muerte celular. En tercer lugar hemos querido identificar las cascadas de señalización involucradas en los efectos de los fármacos.

#### **Metodología experimental:**

Para desarrollar dichos objetivos, se han llevado a cabo los siguientes experimentos:

- 1). Evaluación del efecto de diferentes tiopurinas sobre la autofagia celular; mediante:
  - a. Cuantificación del número de células HepG2 en autofagia tras el tratamiento con azatioprina, mediante la tinción de las vesículas autofágicas con naranja de acridina y posterior visualización por microscopía confocal de fluorescencia.
  - b. Visualización de las células autofágicas tras el tratamiento con azatioprina mediante microscopía electrónica.
  - c. Caracterización bioquímica de la autofagia mediante el análisis de la expresión de las proteínas LC3-I/ LC3-II tras el tratamiento con azatioprina mediante inmunoblot.
- 2). Evaluación del efecto de la azatioprina, sola o en combinación con la bafilomicina A1, sobre la apoptosis y/o necrosis de las células HepG2.
- 3). Análisis de la cascada de señalización ERK/mTOR/p70S6K en las células HepG2 durante la autofagia inducida por azatioprina mediante inmunoblot.

### **Resultados y discusión:**

Nuestros resultados, junto con los datos previos de la bibliografía, sugieren que la autofagia inducida por azatioprina en las células hepáticas puede ser un mecanismo adaptativo que proteja la célula de los efectos deletéreos del fármaco. Dicha observación puede tener dos tipos de repercusiones farmacológicas opuestas según la célula de que se trate:

- a) En el hepatocito normal, la activación de la autofagia puede prevenir de la hepatotoxicidad que a veces se asocia con la azatioprina.
- b) En el hepatocito tumoral, dicha activación puede tener un efecto protector por lo que la inhibición de la autofagia inducida por azatioprina puede ser de utilidad en la destrucción de la célula neoplásica.

En este capítulo se discute el papel protector de la autofagia para el hepatocito, mientras que en el próximo capítulo se discutirá la aplicación de la regulación de la autofagia en el tratamiento del hepatoblastoma.

Una de las aplicaciones de la azatioprina es el tratamiento de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal. Un 40% de dichos pacientes presentan efectos adversos o resistencia al fármaco [Sandborn WJ, 1998].

Un efecto adverso habitual en el tratamiento con tiopurinas es la hepatotoxicidad. Está asociada con la elevación de las enzimas hepáticas [Fraser AG et al, 2002] que puede ocurrir a partir de los dos meses de tratamiento [Bastida G et al, 2005] y en la mayoría de los casos es reversible, ya que las enzimas hepáticas vuelven a niveles normales después del cese del tratamiento [Rogler G, 2010]. Por otro lado, además de cambios serológicos, la hepatotoxicidad puede generar cambios anatómicos como pueden ser: dilatación sinusoidal, hiperplasia nodular regenerativa, fibrosis, peliosis o enfermedad veno-oclusiva hepática; todos estos efectos adversos son dependientes de la dosis y del tiempo de tratamiento [Vernier-Massouille G et al, 2007]. Estudios epidemiológicos sugieren que la hepatotoxicidad de las tiopurinas está asociada a niveles elevados de ribonucleótidos de 6-metilmercaptopurina (ribonucleótidos de 6-MMP) [Gardiner SJ et al, 2008]. Sin embargo esta asociación no es muy consistente, como indican algunos estudios realizados en hepatocitos humanos y de rata en cultivo donde la toxicidad inducida por las tiopurinas es consecuencia de la disminución del nivel de ATP celular y de las alteraciones mitocondriales producidas, dichas alteraciones son mucho mayores en el tratamiento con AZA y 6-MP que con 6-TG [Petit E et al, 2008] [Menor C et al, 2004]. Por el contrario 6-TG tiene mayores efectos sobre el ADN que las otras tiopurinas, porque se incorpora con mayor facilidad a dicha biomolécula que AZA o 6-MP, lo que implica que 6-TG posee un perfil farmacológico y toxicológico diferente a AZA o 6-MP y por lo tanto un tipo de hepatotoxicidad distinta [Coulthard SA et al, 2002], lo que podría ser explicado por el hecho de que sólo AZA y 6-MP alteran el metabolismo mitocondrial al alterar el consumo de oxígeno y la funcionalidad del poro de permeabilidad transitoria conduciendo al daño mitocondrial [Menor C et al, 2004]. Estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren que la toxicidad hepática inducida por AZA da lugar al incremento del estrés oxidativo lo que conduce a una cascada en la que se activan de manera secuencial, las proteínas quinasas (JNK y p38), la apertura del poro de permeabilidad transitoria y la consiguiente depleción de ATP y muerte por necrosis [Menor C et al, 2004], [Lee AU et al, 2001], [Tapner MJ et al, 2004]. Sin embargo, los hepatocitos humanos en cultivo [Petit E et al, 2008] y las células HepG2 de hepatoblastoma son más resistentes al

tratamiento con AZA que los hepatocitos de rata [Menor C et al, 2004], lo que sugiere la existencia de mecanismos protectores que no están presentes en los hepatocitos de rata. Uno de estos mecanismos protectores podría ser la autofagia.

En la línea celular HepG2, la azatioprina activa la autofagia sin provocar muerte celular por necrosis o apoptosis. El proceso autofágico fue observado por el incremento de lisosomas teñidos con naranja de acridina y posteriormente visualizados por microscopía confocal de fluorescencia, además se estudió por microscopía electrónica el aumento de vesículas autofágicas. Mediante inmunoblot se observó un aumento de LC3-II (proteína marcadora de autofagia) tras el tratamiento con AZA. Dicho efecto fue dependiente de la dosis y del tiempo de tratamiento con el fármaco. El aumento de LC3-II también se observó después del tratamiento con otras tiopurinas. El aumento de la autofagia se correlacionó con la activación de p70S6K para todas las tiopurinas utilizadas, salvo para el caso de la 6-TG. El tratamiento con AZA de las células HepG2 dio lugar a la activación de la vía de señalización ERK/mTOR/p70S6K, lo que no se observó para la 6-TG. Sin embargo esta última tiopurina produjo un aumento de la autofagia, lo que sugiere que actúa por un mecanismo diferente al resto de las tiopurinas e independiente de p70S6K. En este sentido, Zeng y colaboradores [Zeng X et al, 2007] han sugerido que 6-TG se incorpora al ADN produciendo mutaciones e induciendo por lo tanto el sistema de reparación del ADN "*DNA mismatch repair system (MMR)*" encargado de mantener la integridad del genoma, como se ha descrito previamente en la introducción [Swann PF et al, 1996]. Cuando se activa el sistema MMR, como consecuencia de la incorporación de 6-TG al ADN, se inducirá la expresión de p53 que activa la transcripción de genes que conducen a la muerte de la célula. En este mecanismo se requieren varios días para producir la autofagia primero, luego la parada del ciclo y por último la muerte celular [Zeng X et al, 2007] sin embargo el mecanismo que tiene lugar con AZA es mucho más rápido (12 horas) ya que no es necesaria la incorporación de los tionucleótidos al ADN para generar autofagia. Además, otra tiopurina como es la 6-MMP, que no es transformada por la enzima HGPRT, estimula también la autofagia sin incorporación significativa al ADN, lo cual demuestra que las tiopurinas estimulan la autofagia celular por mecanismos diferentes.

Cuando las células HepG2 fueron tratadas con AZA no se observó ni apoptosis ni necrosis lo que indica que la autofagia inducida por AZA no es suficiente para

producir muerte celular, en cambio cuando el tratamiento es acompañado por la adición de un inhibidor de la bomba de protones del lisosoma como la Bafilomicina A1, las células no pueden degradar el material celular dañado, orgánulos y proteínas, almacenado en el autofagolisosoma, y entran en apoptosis. En esta última situación descendiendo la actividad proteolítica no se puede recuperar la energía contenida en los restos celulares dañados y las células entran en apoptosis y mueren.

El mecanismo molecular de autofagia, descrito en este trabajo, y que se produce cuando tratamos las células HepG2 con AZA (o 6-MP) podría ser un proceso adaptativo de utilidad para prevenir de la toxicidad producida por el tratamiento de AZA (o 6-MP). En primer lugar se produce el aislamiento de las mitocondrias en el interior de los autofagosomas protegiendo así a la célula de la liberación de calcio y especies reactivas de oxígeno generadas por dicho orgánulo dañado; en segundo lugar, su degradación en el autofagolisosoma producirá la energía necesaria para mantener la viabilidad celular después del estrés inicial generado por el tratamiento con AZA (o 6-MP). Por lo tanto para estos dos fármacos (AZA y 6-MP) la autofagia es una ruta celular que favorece la supervivencia. La 6-TG sin embargo presenta un mecanismo de autofagia diferente al de AZA y 6-MP, esto explicaría la diferencia en los perfiles de hepatotoxicidad de ambos tipos de fármacos. En el caso del tratamiento con 6-TG se observa una hiperplasia nodular regenerativa mientras que para AZA/6-MP se observa hepatotoxicidad necrótica.

### **Conclusiones:**

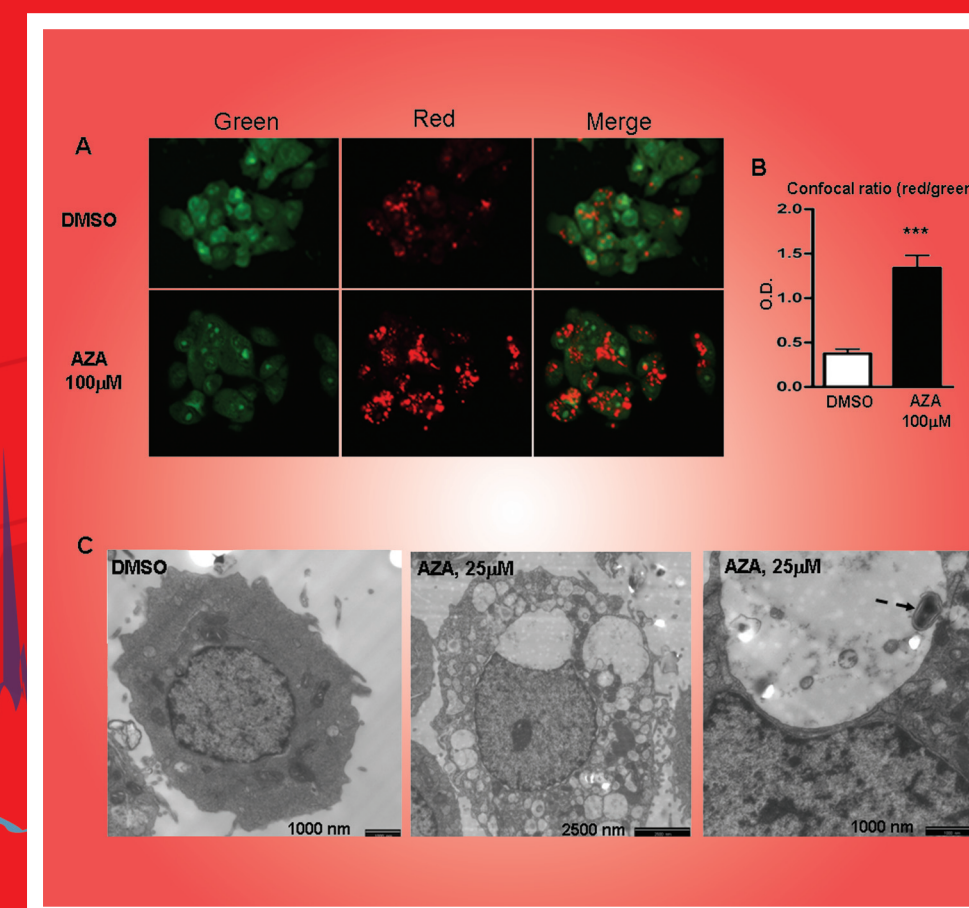
En conclusión, con los datos aportados en este trabajo y con los datos bibliográficos publicados hasta el momento se puede sugerir que la autofagia es un mecanismo celular que protege de los efectos deletéreos provocados por la administración de tiopurinas, así mismo, la regulación de este proceso podría ser una herramienta terapéutica para disminuir la hepatotoxicidad inducida por estos fármacos. En el capítulo siguiente se profundiza en el estudio del papel que juega la autofagia inducida por AZA en la supervivencia de las células tumorales de origen hepático.

Los resultados y la discusión de este conjunto de experimentos dieron lugar a la publicación del artículo titulado: **“Is the autophagy induced by thiopurines beneficial or deleterious?”** en la revista científica *“Current drug metabolism”* 2012, 13: 1267-1276. También fue portada del mismo número de la revista.





# Current Drug Metabolism

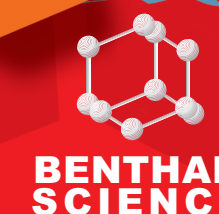


*The international  
journal for timely  
in-depth reviews  
on Drug Metabolism*

Abstracted/Indexed in: Chemical Abstracts, MEDLINE / Index Medicus, BIOSIS, Science Citation Index-Expanded™ (SciSearch®), Journal Citation Reports / Science Edition, Biochemistry & Biophysics Citation Index®, Index to Scientific Reviews®, BIOSIS Previews, BIOSIS Reviews Reports and Meetings, EMBASE / Excerpta Medica, PubsHub, Scopus, PubMed, MediaFinder®-Standard Periodical Directory, Genamics JournalSeek, J-Gate

Impact Factor: 5.113 (2011 SCI Journal Citation Reports)

Eureka Xpress





## Is the Autophagy Induced by Thiopurines Beneficial or Deleterious?

Luis G. Guijarro<sup>1\*</sup>, Irene D. Román<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno<sup>1</sup>, Javier P. Gisbert<sup>2</sup> and Borja Hernández-Breijo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Toxicología Molecular Hepática, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Alcalá de Henares, 28871, Spain; <sup>2</sup>Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario de la Princesa, Instituto de Investigación Biomédica Princesa (IP) y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid, 28006, Spain

**Abstract:** Thiopurines (azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine), are drugs useful in the treatment of leukemia, autoimmune diseases, as well as in organ transplantation. After many years of use it is still not well understood their mode of action. Recently, several groups have found that thiopurines can activate autophagy by different mechanisms. Autophagy is a process of auto-digestion. After an infection, radiation, injury, oxidative stress, or after drug treatment, the cellular organelles may be damaged. In those cases the damaged structures are recognized by the cell, isolated in a double-membrane vacuole and finally degraded in autolysosomes. The digestion gives rise to biosynthetic precursors needed to regenerate partially destroyed structures, so as to produce the energy essential in the anabolic process. During fasting, the protein aggregates, lipid droplets and glycogen deposits are degraded by this pathway for releasing nutrients to the blood. Therefore this process is of vital importance in the maintaining of cellular functions and in the systemic homeostasis of whole organism. The therapy with thiopurines leads to adverse effects such as myelosuppression and hepatotoxicity whose mechanism is not well understood today. Autophagy is also involved in liver degeneration induced by drugs, alcohol or viruses. Therefore, seems to be very attractive know whether the autophagy induced by thiopurines is the cause of the hepatotoxicity associated with these drugs, or rather, autophagy is a compensatory response that protects the liver against the deleterious effects of the thiopurines. Our results and previous data suggest that autophagy is beneficial for the liver because protects it against the deleterious effects of thiopurines.

**Keywords:** Atg, autophagosome, azathioprine, hepatotoxicity, lysosome, mTOR, 6-thioguanine.

### BACKGROUND

Azathioprine (AZA) is the parent compound of the thiopurine family to which also belong 6-mercaptopurine (6-MP) and 6-thioguanine (6-TG) [1]. Azathioprine was of historic importance in the field of organ transplants because in 1963 it was shown that this molecule prolonged the renal allograft survival [2]. Its effectiveness remains so today is still used in the transplant of kidney [3], heart [4] and liver [5], between others. On the other hand, 6-MP was used for the first time in the treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) with such effectiveness that between preclinical studies [6] and its approbation by FDA in 1953 [7] only a few months elapsed.

Today both molecules remain of great clinical interest as their use has steadily increased over the years. In the 70's the thiopurines came into use in the treatment of a number of autoimmune diseases, such as lupus erythematosus, pemphigus and myasthenia gravis. More recently their use has been extended to the management of patients with chronic inflammatory bowel diseases (IBDs), including Crohn's disease and ulcerative colitis) and multiple sclerosis.

At the present time, AZA is considered the gold standard of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel diseases. However, between 10 and 45 percent of patients does not respond adequately to the AZA, so has been combined its use with mesalazine [8], with anti-TNFs [9], with corticosteroids [10] and with allopurinol [11]. Recently, a preclinical study suggests that AZA in combination with buthionine sulfoximine (BSO) could be useful in reducing the volume of solid tumors (manuscript in press).

Despite the time elapsed from arrival of the thiopurines to the clinic there are many gaps in the knowledge of the mechanism of action of these molecules. One of these dark spots is the role played by the thiopurines on cell autophagy and the correlation with its

pharmacological and toxicological effects. So this will be the main objective of this review.

### PHARMACOLOGY OF THIOPURINES

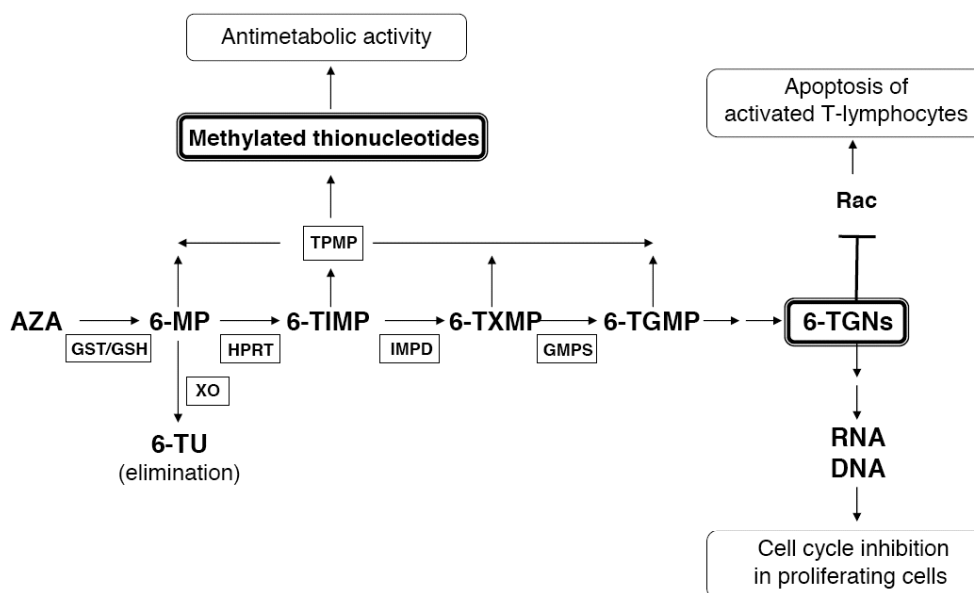
The absorption of AZA is from 16 to 50% of the ingested drug in healthy individuals after which is broken by the liver in two different ways; in 6MP and 1-methyl-4-nitro-5-thioimidazole (90% of absorbed drug) or in hypoxanthine and S-methyl-4-nitro-5-thioimidazole (10% of absorbed drug) [12]. The AZA transformation is GSH-dependent and requires specific isoforms of glutathione-S-transferase [13].

The plasma half-life of 6MP is in the range of 1-2 hours [12]. Both AZA and 6-MP undergo metabolic transformations to 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) which are considered the molecules with immunosuppressive activity (Fig. 1).

The 6-MP is a bifurcation point of AZA metabolism which could be metabolized by three enzymatic pathways: the first pathway is through thiopurine methyltransferase (TPMT) that catalyzes S-methylation of 6-MP to 6-methylmercaptopurine (6-MMP); the second pathway is mediated by xanthine oxidase (XO) that catalyzes the oxidation of 6-MP to the inactive metabolite 6-thiouric acid (6-TU) that is excreted by the kidney and finally; the third pathway converts 6-MP into 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) with the sequential participation of hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) followed by inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) and of guanosine monophosphate synthase (GMPS). The incorporation of 6-thioguanine nucleotides into cytosolic pool and subsequently into nucleic acids (DNA and RNA) perturbs various cellular pathways [1].

The 6-thioguanine nucleotides present in the cytosol were able to block the activation of Rac1, a GTP-binding protein, in human T-lymphocytes stimulated by CD28 [14]. This mechanism is considered today the most important in the pharmacological effect of thiopurines (Fig. 1). Additionally, in the cytosol the S-methylated thiopurine analogs behave as strong inhibitors of purine biosynthesis (PB) *de novo*. [15]. Inhibition of PB is a well-established protocol to achieve immunosuppression and to block the proliferation of

\*Address correspondence to this autor at the Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá. 28871, Alcalá de Henares, Spain; Tel: +34 91 885 4865; Fax: +34 91 885 4585; E-mail: luis\_guijarro@telefonica.net



**Fig. (1).** Schema of azathioprine metabolism and its effects. [AZA: azathioprine; GST: glutathione-S-transferase; GSH: glutathione; 6-MP: 6-mercaptopurine; XO: xanthine oxidase; 6-TU: 6-thiouric acid; TPMT: Thiopurine methyltransferase; HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; 6-TIMP: 6-thioinosine monophosphate; IMPD: Inosine monophosphate dehydrogenase; 6-TXMP: 6-thioxanthosine monophosphate; GMPS: guanosine monophosphate synthetase; 6-TGMP: 6-thioguanine monophosphate; 6-TGNs: 6-thioguanine nucleotides].

various types of lymphocytes [16]. On the other hand, the incorporation of sulphur nucleotides ( $^3\text{G}$ ) to nuclear DNA can lead to cytosine demethylation [17] and it can induce single-strand breaks, interstrand cross-links, DNA-protein cross-links and chromatid damage [18, 19, 20]. Moreover, it has been found that  $^3\text{G}$  in the DNA can be methylated spontaneously to  $\text{S}^6$ -methylthioguanine ( $\text{S}^6\text{mG}$ ) in the presence of *S*-adenosyl-L-methionine [22]. The presence of  $\text{S}^6\text{mG}$  directs the misincorporation of thymine, to give the base pair  $\text{S}^6\text{mG}:\text{T}$  during DNA replication, which is recognized by the system of mismatch repair (MMR) [21]. In response to drug-induced DNA damage, the MMR system arrests the cell cycle and induces the apoptosis of proliferating cells and of tumoral cells [22]. The relevance of this system is corroborated by the fact that MMR-deficient tumor cells are resistant to several drugs used in chemotherapy including 6-thioguanine [21, 23].

The mechanisms of action described so far do not fully explain the pharmacological effects of the thiopurines. Recently, Kinsella' group [23, 24] and our group [25] have described the effect of 6-TG and AZA respectively on autophagy.

## AUTOPHAGY

Autophagy, from the Greek, "auto" oneself, "phagy" to eat, is an evolutionarily conserved pathway for degradation of cellular organelles and long-lived proteins. During autophagy, parts of the cytoplasm or organelles, like damaged mitochondria, peroxisomes, endoplasmic reticulum (ER) and protein aggregates, are sequestered into double-membrane structures termed autophagosomes or autophagic vacuoles [26]. Autophagy occurs at low basal levels in virtually all cells to perform homeostatic functions such as the recycling of proteins and organelles. It is rapidly upregulated when cells need generate intracellular nutrients or energy, for example, during the starvation, growth factors withdrawal, or in high energetic demand situations [27]. Autophagy is also upregulated when cells are preparing to undergo structural remodeling such as during development or to rid themselves of damaged components. This pathway is activated during oxidative stress, hypoxia, infection, radiation, or during exposition to xenobiotics (lithium, cannabinoids) [28-30]. Nutritional status and pancreatic hormones are very

important in the control of autophagy. The high level of insulin leads to autophagy inhibition whereas the high level of glucagon activates the autophagic process [27]. Other physical and chemical parameters like growth factors, temperature, oxygen concentrations and cell density are important in the control of autophagy [28-30].

Autophagy is a catabolic process ATP-dependent and for this reason highly regulated. It is involved, as mentioned above, in different processes such as cellular growth, morphogenesis, cell differentiation, cellular homeostasis (synthesis/degradation balance of cellular components), adaptation to nutrient deprivation and the regulation of metabolism (for example by eliminating enzymes), tissue remodeling, aging and in cellular defense against pathogens [26-31].

When autophagy is deregulated or disrupted can cause pathological processes involved in cancer, hepatic diseases, immune diseases, pathogen infection, myopathy, and neurodegenerative diseases like Huntington disease, Parkinson, amyotrophic lateral sclerosis and Crohn's disease [28, 32, 33]. Three types of autophagy (macroautophagy, microautophagy, and chaperone-mediated autophagy) have been identified and they differ with respect to their physiological functions and mode of cargo delivery to the lysosome [34-36].

Macroautophagy is a catabolic mechanism highly regulated that eukaryotic cells use to degrade organelles and long-lived proteins [35]. It is characterized by the presence of vacuoles with double or multiple membranes whose function is highly conserved from yeast to humans. The second type of autophagy is microautophagy. In microautophagy the cell does not produce autophagosomes because the lysosome directly degrades the cytosolic components (including macromolecules like glycogen) and organelles (like parts of nucleus) by invagination. It is poorly understood in mammalian cells [36].

The third type of autophagy is called chaperone-mediated autophagy (CMA). It is a type of autophagy in which involves proteins that are involved in the folding of other proteins known as chaperones. CMA can degrade proteins which can not be degraded by the ubiquitin-proteasome system due to steric hindrance. A prerequisite for the protein is to present the amino acid sequence motif KFERQ

(Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), that can be recognized by that system to cross the lysosomal membrane. In CMA the materials to degrade are transported one by one through the membrane of the lysosome, and only the proteins are degraded and not the organelles [37].

The molecular mechanism of autophagy has been delineated in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by genetic screening [29]. Currently, have been identified 32 different autophagy-related genes (Atg), and many of them are conserved across phylogenetic tree [38]. Atg proteins (AuTophagy-related proteins) are required for the activation of autophagy, the formation of the autophagosome, the sequestration of damaged constituents, and the fusion between autophagosomes and lysosomes where the contents are degraded or recycled.

The machinery for the macroautophagy (henceforth referred to as “autophagy”) is summarized in (Fig. 2), in this process there are five key steps: a) the nucleation, which consists in the phagophore formation, its origin is controversial, and likely derives from lipid bilayer contributed by the endoplasmic reticulum (RE), the trans-

Golgi apparatus, the late endosomes and possibly even from the nuclear envelope. This early stage is regulated by the Atg1/Atg13 complex which is involved in the recruitment and release of other Atg proteins to the phagophore assembly site; b) the elongation of the phagophore by incorporation of conjugated Atg5-Atg12 with Atg16L to form a multimeric complex that associates with membranous structures to expand the phagophore; c) the modeling of the phagophore by LC3-II incorporation into the growing phagophore. The asymmetric incorporation of LC3-II to the membrane produces the curvature in the autophagosome. LC3-II is obtained from proteolysis of inactive precursors and subsequent incorporation of phosphatidyl ethanolamine (PE) into the N-terminal residue. LC3-II is commonly used to monitor autophagy; d) the completion of the autophagosome by the capture of targets used for proteolytic degradation. This process is accompanied by recycling of some LC3-II promoted by Atg4 protease; e) the formation of autolysosome by fusion of the autophagosome with the lysosome. The mix of engulfed molecules and organelles with lysosomal proteases in pres-

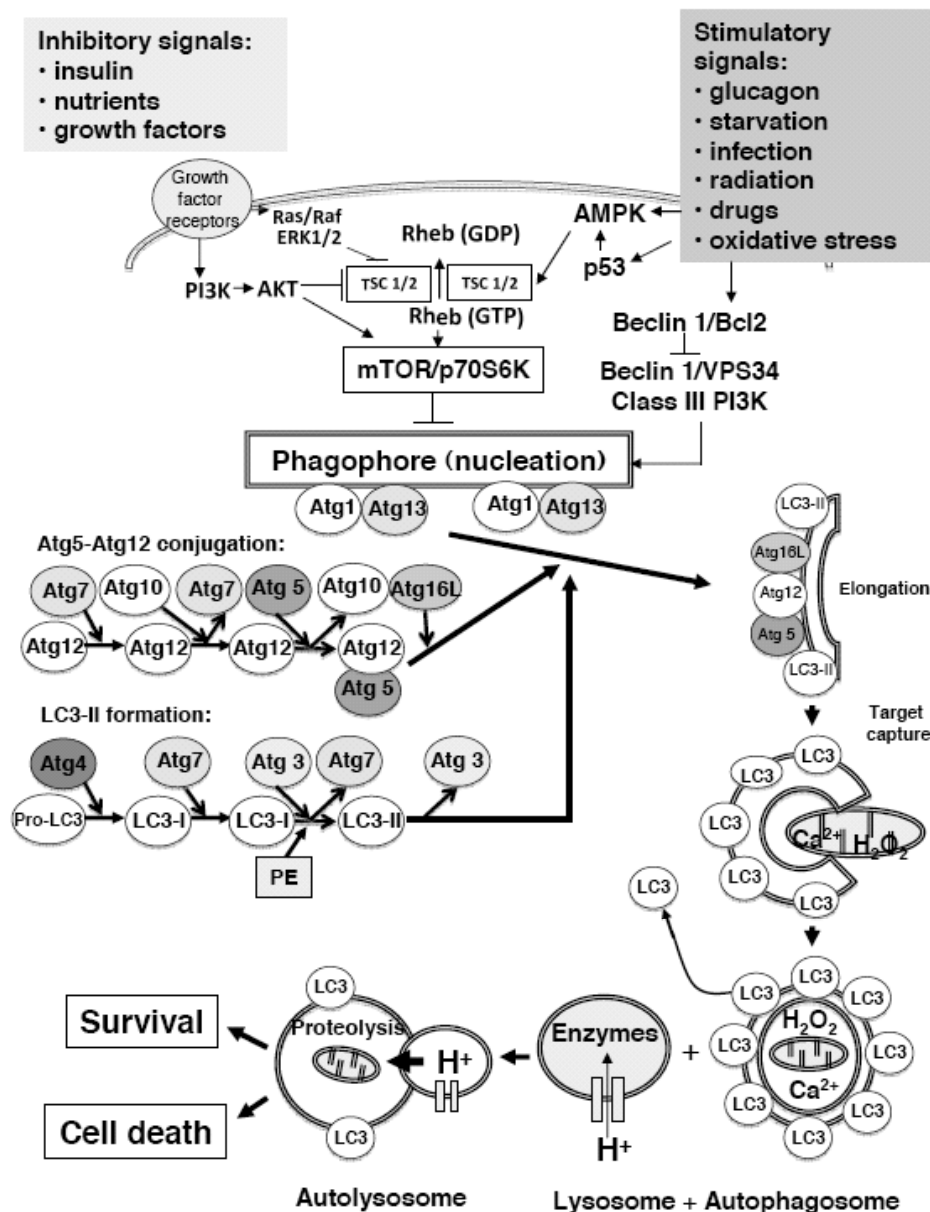


Fig. (2). Schema of regulation of autophagy.

ence of a high concentration of protons produces proteolytic degradation of the components. (See [26, 27, 29, 32] for details of the reactions involved in each step). This degradation can be inhibited with lysosomal proton channel blockers like Bafilomycin A1 [39].

Autophagy is controlled mainly, but not exclusively: a) by stress-related stimuli; and b) by intake and fasting cycles, and the corresponding pancreatic hormones, insulin and glucagon respectively [32]. The stress generated in the reticulum endoplasmic produces the release of Beclin1 (mammalian homolog of Atg6) from Bcl2 and the subsequent formation of the Beclin1/VSP34 complex (Fig. 2). VSP34 is unique amongst PI3-kinases because uses phosphatidylinositol (PI) as substrate to generate phosphatidyl inositol triphosphate (PI3P). The incorporation of this lipid to membranes of the phagophore is essential for their elongation and recruitment of other Atg proteins [32]. Beclin 1 is an allosteric modulator of Vsp34 and their interaction promotes its catalytic activity and increasing PI3P levels [26, 32]. This pathway is very important in the maintaining of the integrity of intracellular organelles and proteins in basal and during stress conditions.

However, how is autophagy induced in response to starvation signals?. Or how is repressed after nutrient intake?. A major player in nutrient sensing and in regulating autophagy is the target of rapamycin (TOR) kinase (Fig. 2), which is a downstream component of the PI3K pathway [26, 27]. In mammals mTOR is the upstream activator of p70S6 Kinase which phosphorylates ribosomal S6 protein at many sites and stimulates the protein synthesis at the ribosome level. The stimulation of mTOR/p70S6K pathway has been considered a main characteristic for cell growth activation and autophagy inhibition [40].

During starvation mTOR is inhibited, which causes activation of autophagy [27]. There are several upstream signaling pathways regulating mTOR and therefore autophagy. For example when the cell is subjected to radiation, infection or presence of xenobiotics the autophagy is activated by AMP-activated protein kinase (AMPK)/ Bnip3 signaling pathway, by P53 or by extracellular-signal-regulated kinase (ERK). When ERK is activated, its substrate TSC-2 is inhibited by phosphorylation which blocks the GTPase activity of GTP-Rheb and Rheb remains activated. As consequence, GTP-Rheb phosphorylates mTOR on Ser2448 which leads to activation of P70S6K that is really related to the genesis of autophagy [25, 26, 41]. The serine/threonine protein kinase Atg1 and Atg13 are good candidates to connect mTOR/p70S6K and autophagy. In *Saccharomyces cerevisiae* [42] and in *Drosophila* [43], the Atg1/Atg13 complex promotes the recruitment of additional Atg proteins for the phagophore assembly to initiate by this way autophagy. Under favorable growth conditions, the stimulation of TOR signaling produces the phosphorylation of Atg 13 causing a decrease in its affinity for Atg1, and inhibiting autophagy. In higher eukaryotes, the mechanism of autophagy regulation by mTOR is less well understood. Some reports have showed that disruption of Ulk1 (the mammalian homologue of Atg 1) through siRNA-mediated depletion, disrupts the autophagy induced by starvation [44] which suggest a similar mechanism in mammals.

The autophagic signal can lead to different scenarios such as cell survival or cell death. Autophagy can be protective because the aberrant proteins and damaged organelles can be degraded and this degradation protects the cell against malfunction [35]. For instance, when different chemical or physical agents disturb the cell, and depolarized the mitochondrial membrane, the cell can activate autophagy to protect itself from the consequent activation of mitochondrial-dependent cell death or intrinsic apoptosis pathway [31]. Moreover, the sequestration of injured organelles in the autophagosome could protect the cell from necrosis induced by the release of calcium and oxygen free radicals. If autophagy leads to cell death it can occur in two different ways; by apoptosis (type I cell death) or directly by autophagy (type II cell death) [31].

Both autophagic cell death and apoptosis may be connected,

because several research results showed that if autophagy was activated as an adaptive response to an external injury and after inhibited by 3-methyladenine or by bafilomycin A1, cells die by apoptosis [45]. These results suggest that the accumulation of damaged organelles stimulates a programmed cell death.

In contrast, sometimes there is a lot of autophagy in the cell and it leads to autophagic cell death [46]. On the other hand, both processes may exist simultaneously in the same cell. These discoveries indicate a possible connection between these two cellular phenomena. Autophagic cell death (type II) occurs when there is an excessive autophagy in the cell and it presents different features than apoptosis. Death by autophagy is a caspase-independent programmed cell death [47].

When autophagy leads to cell death, different changes occur in the cell compartments: in the nucleus there will be partial chromatin condensation, but there will not be DNA laddering and the nucleus will be intact until late stages; in the cytoplasm there will be increase on autophagic vesicle number, increase of lysosome number and lysosome activity, enlarged Golgi apparatus and cytoplasmic membrane blebbing [48].

### ROLE OF AUTOPHAGY ON THIOPURINE-INDUCED ADVERSE DRUGS REACTIONS

In patients with IBD treated with AZA, 40% of them discontinued treatment due to adverse events and/or therapeutic failure [49]. One reason is the myelotoxicity, which has been correlated with high levels of 6-thioguanine nucleotides (6-TGNs) in blood [50]. This feature has been explained by TPMT deficiency [51] due to mutations of the TPMT gene [52]. The decrease in TPMT activity, causes accumulation of 6-TGNs in myeloid precursors cells which leads to pancytopenia and leucopenia [53]. When the concentrations of 6-TGNs are too low, was observed a failure of therapeutic effect [54].

As indicated above autophagy can degrade aberrant or modified proteins to protect the cell against damage. Sometimes there are mutated proteins in the cell which can not perform their function correctly; it is the case of TPMT that can suffer mutations and loss the activity [55] and when this activity is lost, the treatment with thiopurines could generate adverse effects as myelotoxicity.

Recently has been showed the role of autophagy in the elimination of TPMT mutated isoforms. In this sense, the most common mutation of TPMT in Caucasian population is TPMT\*3A [56]. TPMT\*3A can be degraded through the autophagic pathway because when autophagy is inhibited with 3-methyladenine TPMT\*3A is not degraded and can form aggregates. In addition, in cell expressing TPMT\*3A, the depletion of Atg7, using siRNA technology, increased the appearance of TPMT\*3A aggregates. Other data show that the degradation of TPMT\*3A is faster than TPMT wild type, and is carried out by chaperone mediated autophagy (CMA) [52]. This degradation is also faster in other mutations of TPMT such as TPMT\*3C and TPMT\*27 than in TPMT wild type [55]. The above data suggest that proteins involved in autophagy could be therapeutic targets to prevent myelotoxicity induced by thiopurines or to restore the patient with myelotoxicity.

The gastrointestinal adverse effects of therapy with thiopurine are also a frequent cause of discontinuation of treatment. In a 1-year trial of 6-TG therapy that included 95 patients, were observed gastrointestinal complaints (8.4%), hepatotoxicity (4%) and pancreatitis (1%) in the patients enrolled in the trial [57]. Hepatotoxicity is a concern for physicians when they prescribe thiopurines. The definition of hepatotoxicity varies according to studies, if only considered the elevation of liver enzymes there is great variability in the proportion (between 0% and 17%) of patients with hepatotoxicity when treated with 6-MP or AZA [58, 59, 60]. The elevation of liver enzymes occurs after a mean of 85 days of



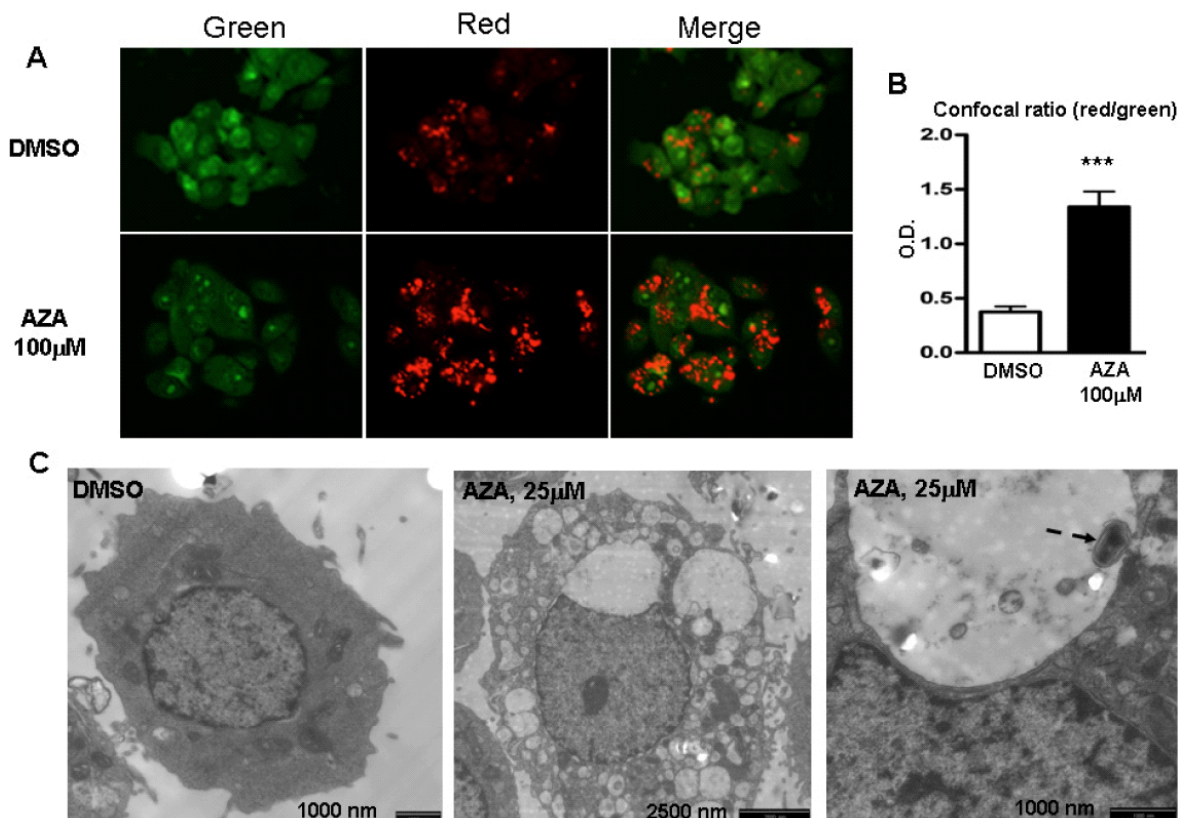
treatment [61] and in most cases appears to be reversible, because upon cessation of therapy, they return to normal [12].

Besides the serological changes, it has been observed anatomical modifications in the structure of the liver during thiopurine therapy. The sinusoidal dilatation, nodular regenerative hyperplasia (NRH), fibrosis, peliosis hepatis and veno-occlusive disease (VOD) are considered to be signs of hepatotoxicity induced by thiopurine. All of them are considered dependent of the time and the dose used in the treatment [62]. The NRH can be very serious for the patient, but it occurs less frequently than elevation of liver enzymes and requires a longer treatment with thiopurines for their development [62]. In fact, the cumulative risk was 0.5% at 5 years and 1.25% at 10 years for patients treated with standard doses of azathioprine [62]. As might be expected NRH was more frequent during 6-TG treatment [63]. Whether these histological alterations are reversible as well as the molecular causes are unknown.

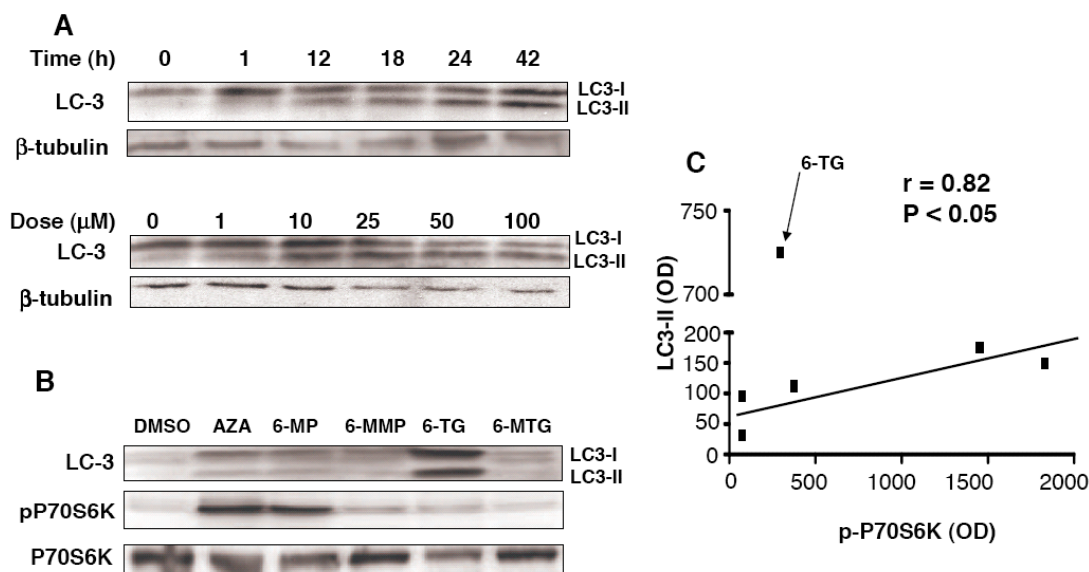
Epidemiological studies suggest that hepatotoxicity of thiopurines is associated with high levels of 6-methylmercaptapurine-ribonucleotides [64]. However, this association has been found inconsistent in some studies. Studies with cultured hepatocytes from human and rat origin showed that the toxic effect of AZA is a consequence of ATP depletion and were more pronounced for AZA and 6-MP than for 6-TG [65]. Similarly, the effect of AZA/6-MP upon mitochondria' metabolism was more potent than this produced by 6-TG [65, 66]. On the contrary 6-TG is incorporated more frequently than AZA/6-MP to DNA [67]. This different pharmacological profile could have repercussions on the type of hepatotoxicity induced by thiopurines. These differences could be explained by the fact that only AZA and 6-MP disturb mitochondria's metabolism by altering oxygen consumption and MPT pore functionality, which lead to mitochondrial swelling and injury [66].

Animal studies suggest that the following model could explain acute liver necrosis induced by AZA; the metabolism of the drug by the hepatocyte would increase oxidative stress which in turn would activate stress-activated protein kinases (JNK and p38). These two pathways lead to mitochondrial dysfunction, opening of MPT pore and subsequent depletion of ATP and death by necrosis [66, 68, 69]. The majority of these alterations could be blocked by treatment with N-acetyl-L-cysteine (NAC) a precursor of glutathione (GSH) [66, 68]. If damaged mitochondria due to the presence of AZA are removed by autophagy, the effects of the drug would be less deleterious. Hepatocytes isolated from human normal liver [65] or from human hepatoblastoma [25] are more resistant to AZA than that rat hepatocytes [66] suggesting the existence of protective mechanisms in human being. We have used hepatocytes derived from human hepatoblastoma (Hep G2 cell line) to study AZA metabolism. In this cell line, azathioprine treatment at standard doses did not lead to necrosis, however this treatment led to autophagy, which reverted with the time [25].

The autophagic process was observed by the increase of lysosomes which was visualized by staining with acridine orange (Fig. 3A and 3B) and by the presence of autophagosomes visualized by electron microscopy (Fig. 3C). The autophagy induced by AZA in HepG2 cells, was dependent on time and dose, as we can see by the increase of LC3-II, a protein marker to monitor autophagy (Fig. 4A). The increase of LC3-II is correlated with the activation of P70S6K for the different thiopurines used (Fig. 4B and 4C). All the thiopurines used, 6-MP, 6-MMP, 6-MTG and AZA, have a similar



**Fig. (3).** HepG2 cells were treated with AZA (100 μM) or DMSO during 42h. Then, cells were incubated during 17min with acridine orange (1 μM) and visualized (A) by fluorescence microscopy. The green channel shows the staining of DNA and RNA. The red channel shows lysosomes and organelles with acid pH. (B) Quantification of the ratio of fluorescence (red/green). (C) The HepG2 cells were treated with DMSO or AZA (25 μM) during 12h and then visualized using electron microscopy. Dashed arrow indicates phagocytosed organelles. [DMSO: dimethylsulfoxide; AZA: azathioprine].

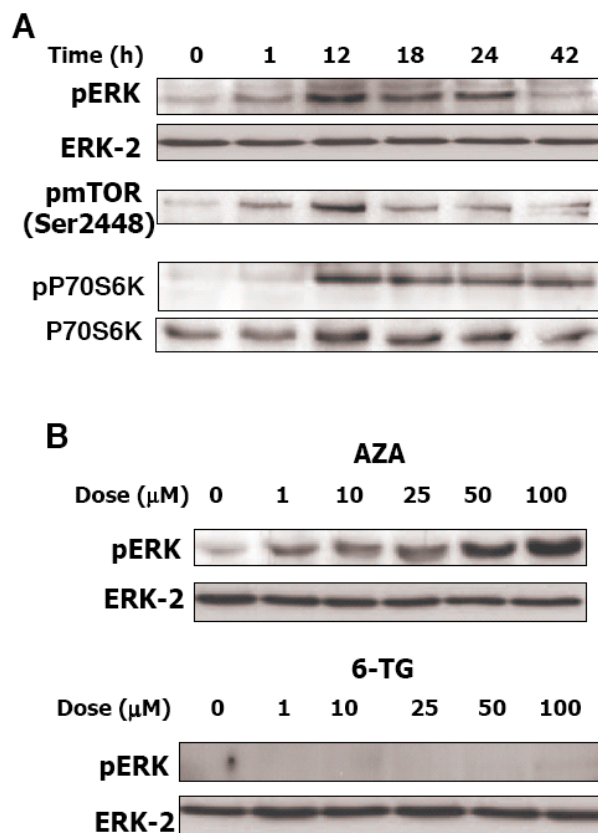


**Fig. (4).** (A) Western blots of LC-3 and  $\beta$ -tubulin. HepG2 cells were treated with i) AZA (50 $\mu$ M) at different times ii) or with AZA at different doses during 42h. (B) HepG2 cells were treated with DMSO and with different thiopurines (100 $\mu$ M) during 42h, and then were performed western blots of LC-3 and p-P70S6K (phosphorylated in Thr421 and Ser424) and total P70S6K. [DMSO: dimethylsulfoxide; AZA: azathioprine; 6-MP: 6-mercaptopurine; 6-MMP: 6-methylmercaptopurine; 6-TG: 6-thioguanine; 6-MTG: 6-methylthioguanine. (C) Correlation of the optical density of western blots of LC-3 versus p-P70S6K (phosphorylated in Thr421 and Ser424) from the panel B results.

behavior in the LC3-II /pP70S6K correlation ( $r = 0.82$ ,  $p < 0.05$ ), except for 6-TG (Fig. 4C). For this last drug, autophagy is increased with the treatment without increasing phosphorylation of P70S6K, this suggest a different mechanism for 6-TG.

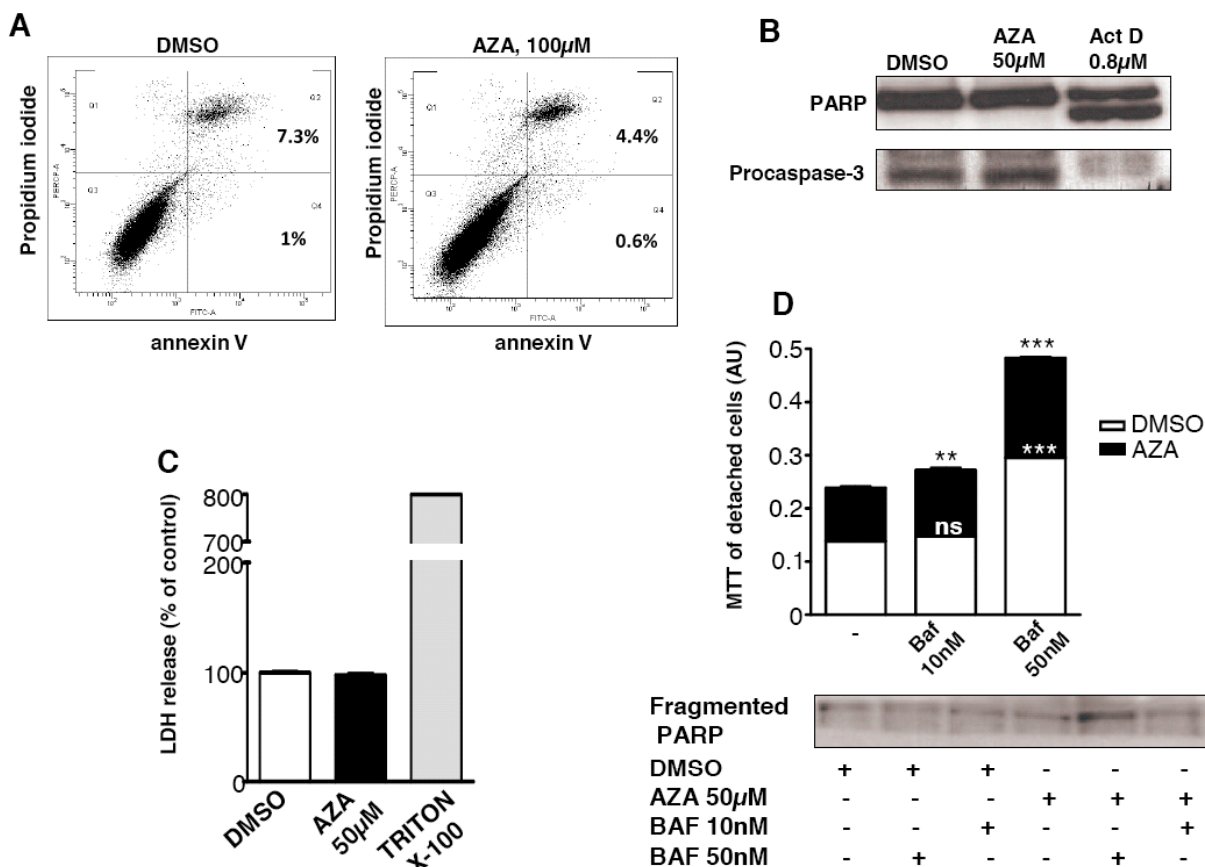
In this context, it has been suggested that 6-TG incorporation to DNA produces genes mutations which induces the DNA mismatch repair (MMR) system [21, 23]. This complex is charged to maintain the genome integrity and when is activated, induces at their turn p53 expression which leads to cell death by autophagy [23]. This last mechanism requires between 48 and 72h for producing autophagy [23], whereas that induced by AZA is a very quickly process which suggests that is not necessary the incorporation of the thionucleotides to DNA to produce such effect (Fig. 4A). Moreover, 6-MMP which is not transformed to the corresponding nucleotide by HPRT enzyme was also able to stimulate autophagy without significant incorporation to DNA (Fig. 4B). This observation clearly demonstrates the existence of different pathways in the autophagy stimulated by thiopurines. The signaling pathway involved in the autophagy induced by AZA is produced by the sequential activation of ERK, mTOR and P70S6K (Fig. 5A). In the kinetic study we observed a clear effect of AZA on LC3-II from 12h of treatment, which is a very short time to activate the MMR system (Fig. 4A). The kinetic studies also show the good correlation existing between autophagy (measured by LC3-II) (Fig. 4A) and the activation of the ERK/mTOR/P70S6K pathway (Fig. 5A). In (Fig. 5B), we observed that AZA was able to stimulate ERK in a dose-dependent manner, whereas 6-TG was unable to do this, which indicated another time the molecular differences between AZA and 6-TG in the induction of autophagy. Previously has been observed the positive effect of sustained activation of ERK on autophagy [70], this new mechanism involves the release of Beclin 1 from endoplasmic reticulum. At present we do not know if it is the same mechanism for AZA.

But what is the role of autophagy induced by AZA?. The autophagy induced by AZA could produce different outcomes in human hepatocytes depending of the activation/inactivation of other



**Fig. (5).** (A) HepG2 cells were treated with AZA (50 $\mu$ M) at different times, and then were carried out western blots of p-ERK, ERK, p-mTOR (phosphorylated in Ser2448), p-P70S6K (phosphorylated in Thr421 and Ser424) and total P70S6K. (B) HepG2 cells were treated with different concentrations of AZA or 6-TG, during 42h; then, were analyzed p-ERK and ERK protein levels by western blot.



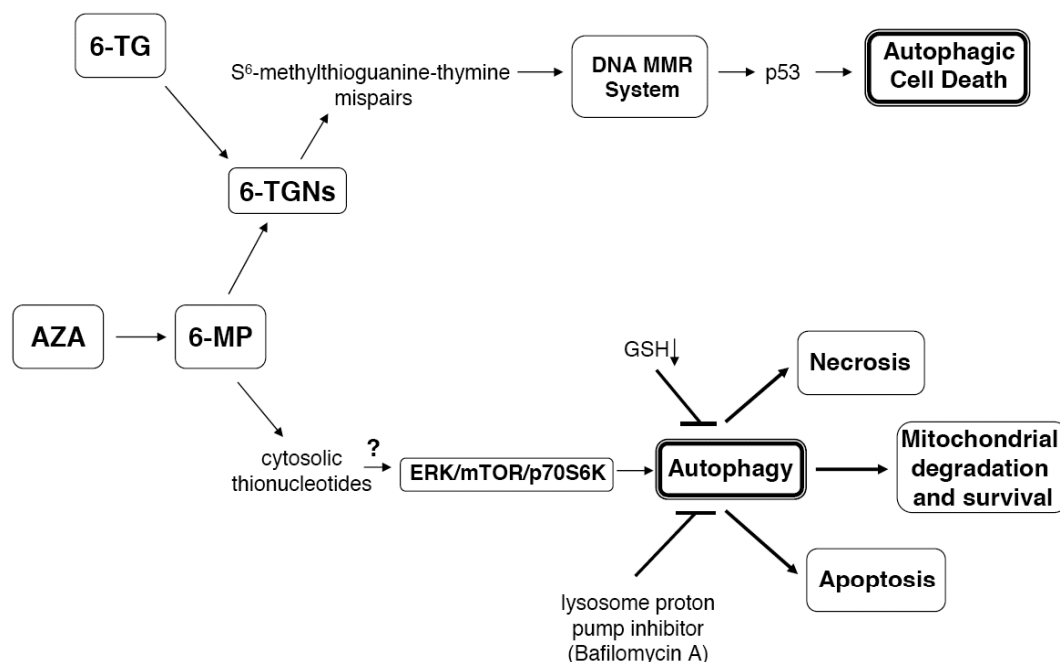


**Fig. (6).** (A) HepG2 cells were treated with DMSO or AZA (100µM) during 42h and then incubated with annexin V and propidium iodide. Apoptotic cells were analyzed using flow cytometry. (B) HepG2 cells were treated with DMSO or AZA (50µM) during 42h and then were analyzed fragmentation of PARP and procaspase-3 by western blot. HepG2 cells treated with Actinomycin D (0.8µM) were used like a positive control of apoptosis. (C) HepG2 cells were treated with DMSO or AZA (50µM) during 42h and then was carried out the analysis of lactate dehydrogenase (LDH) released. Triton X-100 (0.2%) was added to HepG2 cells to get a positive control of necrosis. (D) HepG2 cells were treated with DMSO or AZA (50µM), and with or without Bafilomycin A1 (Baf) (10nM or 50nM) during 42h. After this time was analyzed the metabolic activity and the fragmentation of PARP of detached cells by MTT (reduction of tetrazolium salt) and western blot, respectively. Statistical significance of the comparisons of all values with respect to control (DMSO); (ns) non-significant values; (\*\*)  $P < 0.01$ ; (\*\*\*)  $P < 0.001$ .

concomitant metabolic pathways. When HepG2 cells were treated with AZA was not observed or apoptosis (Fig. 6A and 6B) or necrosis (Fig. 6C). This indicates that AZA-induced autophagy is not sufficient to promote death of hepatocytes. By contrast when autophagy was initiated as consequence of AZA treatment and concomitantly the lysosomal proton pump was blocked by bafilomycin A, the HepG2 cells enter in apoptosis (Fig. 6D). In this situation, the damaged organelles could not be degraded in the autolysosome by decrease in proteolytic activity and the hepatocytes enter in an apoptotic process. These results suggest that when the liver cells are in a healthy state, the autophagy induced by AZA could be an adaptive mechanism involved in cell survival (Fig. 7). So autophagy would be a response mechanism to protect cells against the deleterious effects of AZA.

The mechanism proposed for autophagy induced by 6-TG is very different; it was produced by its incorporation in DNA of proliferating cells, inducing autophagic cell death. This could be helpful in the elimination of damaged cells. In this mechanism, the mismatch repair (MMR) system is activated which in turn activates the p53 expression and the autophagic cell death [23]. This effect is longer in time because requires cellular replication and only the hepatocytes in division would be sensitive. The liver is classified as a slow-renewing organ, and the life-span of hepatocytes has been estimated to be 200-400 days [71] so the number of proliferating

cells is very low. Therefore, the 6-TG will affect only a few hepatocytes. In any case, if hepatocytes with damaged DNA by the thiopurine are not eliminated by the MMR system, the drug could produce a hyperplastic process, in this context; it has been observed nodular regenerative hyperplasia (NRH) at long term with the treatment with thiopurines [62, 63]. A very rare side effect of azathioprine but much more frequent in the treatment with 6-TG [63]. As indicated above, the autophagy induced by AZA (or 6-MP) could be useful to eliminate injured mitochondria with the drug treatment. In this pathway, autophagy is activated very quickly (hours) by the ERK/mTOR/P70S6K system and present several advantages. Firstly, the isolation of injured mitochondria into the autophagosome protects the cell from the release of calcium and oxygen free radicals produced by this organelle. Secondly, their degradation in the autolysosome produces the energy necessary to maintain the cell viability after the initial stress produced by AZA or 6-MP. For these two drugs, the autophagy is a survival pathway. Since autophagy is a process that requires energy, this process would be necrotic when it was accompanied of ATP depletion and/or mitochondrial dysfunction (such as in glutathione depletion). In this context we have showed that HepG2 cells enter in a necrotic program after AZA treatment in glutathione depleted cells (manuscript in press).



**Fig. (7).** Model proposed to explain the mechanism of action of thiopurines in the stimulation of autophagy. [AZA: azathioprine; 6-MP: 6-mercaptopurine; 6-TGNs: 6-thioguanine nucleotides; 6-TG: 6-thioguanine].

As indicated above, autophagy is important to maintain healthy liver and its inhibition may aggravate the pathological processes of this organ [28, 32]. Moreover, during fasting, liver autophagy is important because provides building blocks for biosynthetic pathways for the entire organism [27, 32]. Our data and previous ones suggest that autophagy protects against the deleterious effects of the thiopurines, so that regulation of this process may be a therapeutic interest to avoid hepatotoxicity induced by thiopurines.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflicts of interest.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Dr. Garcia-Honduvilla for his help with electronic microscopy. We thank Unidad de Cultivos Celulares and Servicio de Microscopia Electronica for their technical help. Supported by the following grants: SAF 2008-05355, CCG10-UAH/BIO-5971 and MOIR (S2010/BMD-2423).

#### REFERENCES

- [1] Cara, C.J.; Pena, A.S.; Sans, M.; Rodrigo, L.; Guerrero-Esteo, M.; Hinojosa, J.; Garcia-Paredes, J.; Guijarro, L.G. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med. Sci. Monit.*, **2004**, *10*(11), RA247-254.
- [2] Murray, J.E.; Merrill, J.P.; Harrison, J.H.; Wilson, R.E.; Dammin, G.J. Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. *N. Engl. J. Med.*, **1963**, *268*, 1315-1323.
- [3] Schold, J.D.; Kaplan, B. AZA/tacrolimus is associated with similar outcomes as MMF/tacrolimus among renal transplant recipients. *Am. J. Transplan.*, **2009**, *9*(9), 2067-2074.
- [4] Denfield, S.W. Strategies to prevent cellular rejection in pediatric heart transplant recipients. *Paediatr. Drugs*, **2010**, *12*(6), 391-403.
- [5] Starzl, T.E.; Fung, J.J. Themes of liver transplantation. *Hepatology*, **2010**, *51*(6), 1869-1884.
- [6] Clarke, D.A.; Philips, F.S.; Sternberg, S.S.; Stock, C.C.; Elion, G.B.; Hitchings, G.H. 6-Mercaptopurine: effects in mouse sarcoma 180 and in normal animals. *Cancer Res.*, **1953**, *13*(8), 593-604.
- [7] Burchenal, J.H.; Murphy, M.L.; Ellison, R.R.; Sykes, M.P.; Tan, T.C.; Leone, L.A.; Karnofsky, D.A.; Craver, L.F.; Dargeon, H.W.; Rhoads, C.P. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood*, **1953**, *8*(11), 965-999.
- [8] Swidsinski, A.; Loening-Baucke, V.; Bengmark, S.; Lochs, H.; Dörffel, Y. Azathioprine and mesalazine-induced effects on the mucosal flora in patients with IBD colitis. *Inflamm Bowel Dis.*, **2007**, *13*(1), 51-56.
- [9] Arnott, I.D.; Watts, D.; Satsangi, J. Azathioprine and anti-TNF alpha therapies in Crohn's disease: a review of pharmacology, clinical efficacy and safety. *Pharmacol. Res.*, **2003**, *47*(1), 1-10.
- [10] Panaccione, R.; Rutgeerts, P.; Sandborn, W.J.; Feagan, B.; Schreiber, S.; Ghosh, S. Review article: treatment algorithms to maximize remission and minimize corticosteroid dependence in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **2008**, *28*(6), 674-688.
- [11] Rahhal, R.M.; Bishop, W.P. Initial clinical experience with allopurinol-thiopurine combination therapy in pediatric inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.*, **2008**, *14*(12), 1678-1682.
- [12] Rogler, G. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, **2010**, *24*(2), 157-165.
- [13] Eklund, B.I.; Moberg, M.; Bergquist, J.; Mannervik, B. Divergent activities of human glutathione transferases in the bioactivation of azathioprine. *Mol. Pharmacol.*, **2006**, *70*(2), 747-754.
- [14] Tiede, I.; Fritz, G.; Strand, S.; Poppe, D.; Dvorsky, R.; Strand, D.; Lehr, H.A.; Wirtz, S.; Becker, C.; Atreya, R.; Mudter, J.; Hildner, K.; Bartsch, B.; Holtmann, M.; Blumberg, R.; Walczak, H.; Iven, H.; Galle, P.R.; Ahmadian, M.R.; Neurath, M.F. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, **2003**, *111*(8), 1133-1145.
- [15] Tay, B.S.; Lilley, R.M.; Murray, A.W.; Atkinson, M.R. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem. Pharmacol.*, **1969**, *18*(4), 936-938.
- [16] Elion, G.B. The purine path to chemotherapy. *Science*, **1989**, *244*(4900), 41-47.
- [17] Wang, H.; Wang, Y. 6-Thioguanine perturbs cytosine methylation at the CpG dinucleotide site by DNA methyltransferases *in vitro* and acts as a DNA demethylating agent *in vivo*. *Biochemistry*, **2009**, *48*(10), 2290-2299.
- [18] Christie, N.T.; Drake, S.; Meyn, R.E.; Nelson, J.A. 6-Thioguanine-induced DNA damage as a determinant of cytotoxicity in cultured Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.*, **1984**, *44*(9), 3665-3671.

- [19] Pan, B.F.; Nelson, J.A. Characterization of the DNA damage in 6-thioguanine-treated cells. *Biochem. Pharmacol.*, **1990**, *40*(5), 1063-1069.
- [20] Bodell, W.J. Molecular dosimetry of sister chromatid exchange induction in 9L cells treated with 6-thioguanine. *Mutagenesis*, **1991**, *6*(3), 175-177.
- [21] Swann, P.F.; Waters, T.R.; Moulton, D.C.; Xu, Y.Z.; Zheng, Q.; Edwards, M.; Mace, R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science*, **1996**, *273*(5278), 1109-1111.
- [22] Stojic, L.; Brun, R.; Jiricny, J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)*, **2004**, *3*(8-9), 1091-1101.
- [23] Zeng, X.; Yan, T.; Schupp, J.E.; Seo, Y.; Kinsella, T.J. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin. Cancer Res.*, **2007**, *13*(4), 1315-1321.
- [24] Zeng, X.; Kinsella, T.J. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res.*, **2008**, *68*(7), 2384-2390.
- [25] Hernández-Breijo, B.; Monserrat, J.; González-Rodríguez, A.; Fernández-Moreno, M.D.; Román, I.D.; Álvarez de Mon, M.; Valverde, A.M.; Gisbert, J.P.; Guijarro, L.G. Azathioprine produces autophagy through ERK/mTOR/P70S6K pathway in HepG2 cells. *J. Hepatol.*, **2011**, *54*(S1), S202.
- [26] Glick, D.; Barth, S.; Macleod, K.F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.*, **2010**, *221*(1), 3-12.
- [27] Rabinowitz, J.D.; White, E. Autophagy and metabolism. *Science*, **2010**, *330*(6009), 1344-1348.
- [28] Levine, B.; Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, **2008**, *132*(1), 27-42.
- [29] Klionsky, D.J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*(11), 931-937.
- [30] Mizushima, N.; Klionsky, D.J. Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **2007**, *27*, 19-40.
- [31] Maiuri, M.C.; Zalckvar, E.; Kimchi, A.; Kroemer, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*(9), 741-752.
- [32] Yin, X.M.; Ding, W.X.; Gao, W. Autophagy in the liver. *Hepatology*, **2008**, *47*(5), 1773-1785.
- [33] Kaser, A.; Blumberg, R.S. Autophagy, Microbial Sensing, Endoplasmic Reticulum Stress, and Epithelial Function in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, **2011**, *140*(6), 1738-1747.
- [34] Cuervo, A.M. Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol. Metab.*, **2010**, *21*(3), 142-150.
- [35] Mizushima, N.; Levine, B.; Cuervo, A.M.; Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, **2008**, *451*(7182), 1069-1075.
- [36] Santambrogio, L.; Cuervo, A.M. Chasing the elusive mammalian microautophagy. *Autophagy*, **2011**, *7*(6), 1-3.
- [37] Li, W.; Yang, Q.; Mao, Z. Chaperone-mediated autophagy: machinery, regulation and biological consequences. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2011**, *68*(5), 749-763.
- [38] Klionsky, D.J.; Cregg, J.M.; Dunn, W.A.Jr.; Emr, S.D.; Sakai, Y.; Sandoval, I.V.; Sibirny, A.; Subramani, S.; Thumm, M.; Veenhuis, M.; Ohsumi, Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell*, **2003**, *5*(4), 539-545.
- [39] Kawaguchi, T.; Miyazawa, K.; Moriya, S.; Ohtomo, T.; Che, X.F.; Naito, M.; Itoh, M.; Tomoda, A. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int. J. Oncol.*, **2011**, *38*(3), 643-654.
- [40] Gibbons, J.J.; Abraham, R.T.; Yu, K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. *Semin. Oncol.*, **2009**, *36*(S3), S3-S17.
- [41] Wang, R.C.; Levine, B. Autophagy in cellular growth control. *FEBS Lett.*, **2010**, *584*(7), 1417-1426.
- [42] Stephan, J.S.; Yeh, Y.Y.; Ramachandran, V.; Deminoff, S.J.; Herman, P.K. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **2009**, *106*(40), 17049-17054.
- [43] Chang, Y.Y.; Neufeld, T.P. An Atg1/Atg13 complex with multiple roles in TOR-mediated autophagy regulation. *Mol. Biol. Cell*, **2009**, *20*(7), 2004-2014.
- [44] Young, A.R.; Chan, E.Y.; Hu, X.W.; Kochl, R.; Crawshaw, S.G.; High, S.; Hailey, D.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Tooze, S.A. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.*, **2006**, *119*(Pt18), 3888-3900.
- [45] Kanematsu, S.; Uehara, N.; Miki, H.; Yoshizawa, K.; Kawanaka, A.; Yuri, T.; Tsubura, A. Autophagy inhibition enhances sulfuraphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res.*, **2010**, *30*(9), 3381-3390.
- [46] Chen, R.J.; Ho, C.T.; Wang, Y.J. Pterostilbene induces autophagy and apoptosis in sensitive and chemoresistant human bladder cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, **2010**, *54*(12), 1819-1832.
- [47] Zhao, Q.L.; Fujiwara, Y.; Kondo, T. Synergistic induction of apoptosis and caspase-independent autophagic cell death by a combination of nitroxide Tempo and heat shock in human leukemia U937 cells. *Apoptosis*, **2010**, *15*(10), 1270-1283.
- [48] Gozuacik, D.; Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*, **2004**, *23*, 2891-2906.
- [49] Sandborn, W.J. Azathioprine: state of the art in inflammatory bowel disease. *Scand J. Gastroenterol. Suppl.*, **1998**, *225*, 92-99.
- [50] Hawwa, A.F.; Millership, J.S.; Collier, P.S.; Vandebroek, K.; McCarthy, A.; Dempsey, S.; Cairns, C.; Collins, J.; Rodgers, C.; McElnay, J.C. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J. Clin. Pharmacol.*, **2008**, *66*(4), 517-528.
- [51] Gisbert, J.P.; Niño, P.; Rodrigo, L.; Cara, C.; Guijarro, L.G. Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients. *Am. J. Gastroenterol.*, **2006**, *101*(12), 2769-2776.
- [52] Li, F.; Wang, L.; Burgess, R.J.; Weinsilboum, R.M. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: autophagy as a mechanism for variant allozyme degradation. *Pharmacogenet. Genomics*, **2008**, *18*(12), 1083-1094.
- [53] Best, C.; Sudel, B. Bone marrow suppression in the setting of normal thiopurine methyltransferase phenotype testing. *Clin. Pediatr. (Phila)*, **2010**, *49*(9), 901-903.
- [54] Kwan, L.Y.; Devlin, S.M.; Mirocha, J.M.; Papadakis, K.A. Thiopurine methyltransferase activity combined with 6-thioguanine metabolite levels predicts clinical response to thiopurines in patients with inflammatory bowel disease. *Dig. Liver Dis.*, **2008**, *40*(6), 425-432.
- [55] Feng, Q.; Vannaprasaht, S.; Peng, Y.; Angsuthum, S.; Avihingsanon, Y.; Yee, V.C.; Tassaneeyakul, W.; Weinsilboum, R.M. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Functional characterization of a novel rapidly degraded variant allozyme. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, *79*(7), 1053-1061.
- [56] Wang, L.; Weinsilboum, R.M. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: insights, challenges and future directions. *Oncogene*, **2006**, *25*(11), 1629-38.
- [57] de Boer, N.K.; Mulder, C.J.; van Bodegraven, A.A. Myelotoxicity and hepatotoxicity during azathioprine therapy. *Neth. J. Med.*, **2005**, *63*(11), 444-446.
- [58] Dubinsky, M.C.; Lamothe, S.; Yang, H.Y.; Targan, S.R.; Sinnett, D.; Théorêt, Y.; Seidman, E.G. Pharmacogenomics and metabolite measurement for 6-mercaptopurine therapy in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, **2000**, *118*(4), 705-713.
- [59] Fraser, A.G.; Orchard, T.R.; Jewell, D.P. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut*, **2002**, *50*(4), 485-489.
- [60] Schwab, M.; Schäffeler, E.; Marx, C.; Fischer, C.; Lang, T.; Behrens, C.; Gregor, M.; Eichelbaum, M.; Zanger, U.M.; Kaskas, B.A. Azathioprine therapy and adverse drug reactions in patients with inflammatory bowel disease: impact of thiopurine S-methyltransferase polymorphism. *Pharmacogenetics*, **2002**, *12*(6), 429-436.
- [61] Bastida, G.; Nos, P.; Aguas, M.; Beltrán, B.; Rubín, A.; Dasí, F.; Ponce, J. Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol. Ther.*, **2005**, *22*(9), 775-782.
- [62] Vernier-Massouille, G.; Cosnes, J.; Lemann, M.; Marteau, P.; Reinisch, W.; Laharie, D.; Cadiot, G.; Bouhnik, Y.; De Vos, M.; Boueille, A.; Duclos, B.; Seksik, P.; Mary, J.Y.; Colombel, J.F. Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut*, **2007**, *56*(10), 1404-1409.

- [63] Dubinsky, M.C.; Vasiliauskas, E.A.; Singh, H.; Abreu, M.T.; Papadakis, K.A.; Tran, T.; Martin, P.; Vierling, J.M.; Geller, S.A.; Targan, S.R.; Poordad, F.F. 6-thioguanine can cause serious liver injury in inflammatory bowel disease patients. *Gastroenterology*, **2003**, *125*(2), 298-303.
- [64] Gardiner, S.J.; Geary, R.B.; Burt, M.J.; Ding, S.L.; Barclay, M.L. Severe hepatotoxicity with high 6-methylmercaptopurine nucleotide concentrations after thiopurine dose escalation due to low 6-thioguanine nucleotides. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **2008**, *20*(12), 1238-1242.
- [65] Petit, E.; Langouet, S.; Akhdar, H.; Nicolas-Nicolaz, C.; Guillouzo, A.; Morel, F. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicol. In vitro*, **2008**, *22*(3), 632-642.
- [66] Menor, C.; Fernández-Moreno, M.D.; Fueyo, J.A.; Escibano, O.; Olleros, T.; Arriaza, E.; Cara, C.; Lorusso, M.; Di Paola, M.; Román, I.D.; Guijarro, L.G. Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2004**, *311*(2), 668-676.
- [67] Coulthard, S.A.; Hogarth, L.A.; Little, M.; Matheson, E.C.; Redfern, C.P.; Minto, L.; Hall, A.G. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol. Pharmacol.*, **2002**, *62*(1):102-109.
- [68] Lee, A.U.; Farrell, G.C. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *J. Hepatol.*, **2001**, *35*(6), 756-764.
- [69] Tapner, M.J.; Jones, B.E.; Wu, W.M.; Farrell, G.C. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury. *J. Hepatol.*, **2004**, *40*(3), 454-463.
- [70] Wang, J.; Whiteman, M.W.; Lian, H.; Wang, G.; Singh, A.; Huang, D.; Denmark, T. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J. Biol. Chem.*, **2009**, *284*(32), 21412-21424.
- [71] Magami, Y.; Azuma, T.; Inokuchi, H.; Kokuno, S.; Moriyasu, F.; Kawai, K.; Hattori, T. Cell proliferation and renewal of normal hepatocytes and bile duct cells in adult mouse liver. *Liver*, **2002**, *22*(5), 419-425.



Universidad  
de Alcalá

# *CAPÍTULO II*

---

---

*“No hay sensación más apasionada que el  
hallazgo de algo que uno sabe que es nuevo  
y que lo ve por primera vez”*

**Severo Ochoa**



## CAPÍTULO II

### **EFECTO DE LA AZATIOPRINA SOBRE LA CASCADA DE SEÑALIZACIÓN DEL IGF-1 EN CÉLULAS CANCEROSAS DE ORIGEN HEPÁTICO. REPERCUSIONES CELULARES.**

#### **Justificación del trabajo:**

En este segundo capítulo de la tesis doctoral se describirá el efecto que produce la azatioprina sobre la señalización celular mediada por el IGF-1 en líneas celulares procedentes de diferentes hepatomas y de hepatocitos inmortalizados. El IGF-1 (factor de crecimiento similar a la insulina-1) está considerado como un mitógeno completo para las células HepG2 ya que en presencia de dicha hormona se obtienen niveles de crecimiento y proliferación similares a los que se pueden producir en presencia de suero fetal bovino [Cuevas EP et al, 2007]. Además es una hormona muy importante en el desarrollo del cáncer por estar altamente implicada en la supervivencia de las células cancerosas al inhibir la apoptosis y estimular la proliferación. También es importante en la producción de metástasis debido a que regula la adhesión y la migración [LeRoith D et al, 2003]. La disminución de la señalización mediada por IGF-1 es un objetivo para el tratamiento de numerosos tipos de cáncer. Las células HepG2 producen IGF-1 dando lugar a un bucle autocrino de estímulo [Stuver SO et al, 2000] [Fernando J et al, 2012] [Shimizu M et al, 2008] por lo que es un buen modelo para el estudio del efecto de la azatioprina sobre el sistema de señalización del IGF-1. Además se considera un buen modelo de hepatoblastoma, al igual que otras líneas celulares como HuH6, HepT1 o HepT3 [Ellerkamp V et al, 2011] [Hartmann W et al, 2000].

El hepatoblastoma constituye el 1% de los cánceres pediátricos [Darbari A et al, 2003] aumentando su incidencia en niños nacidos con bajo peso [Ribons LA et al, 1998]. Su tratamiento actualmente está basado en la quimioterapia sistémica, en la cirugía o en la combinación de ambas [Malogolowkin MH et al, 2008] [Kim T et al, 2012] [Li JP et al, 2008] [Ye J et al, 2008]. Sin embargo, el 30% de los niños no

responden a estos tratamientos [Sivaprakasam P et al, 2011]. Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de los genes que codifican para las proteínas IGF-1 e IGF-2 está relacionada con un peor pronóstico de la enfermedad, habiéndose correlacionado con la presencia de metástasis [Shin E et al, 2011] [Adesina AM et al, 2009].

En el momento actual se están evaluando, en sus fases clínicas, para el tratamiento del cáncer de hígado anticuerpos monoclonales (A12 o el Cituxumumab), que se unen al receptor de membrana IGF-1R bloqueando los efectos del IGF-1 y por lo tanto disminuyendo la proliferación celular y la actividad metabólica de las células cancerosas [Tovar V et al, 2010].

### **Hipótesis y objetivos concretos:**

La sensibilidad de la célula al IGF-1 depende de la expresión de la proteína adaptadora IRS-1, la cual está regulada negativamente por la cascada TSC-1-TSC-2/Rheb/Raptor-mTOR/S6K1 [Shah OJ et al, 2006]. Dado que habíamos observado que la azatioprina era capaz de activar dicha cascada, nos propusimos estudiar el efecto del fármaco sobre la sensibilidad de las células tumorales hepáticas al IGF-1, así como sus efectos sobre la muerte celular, sola o en combinación con la bafilomicina A1.

### **Metodología experimental:**

Para la consecución de los diferentes objetivos, realizamos los siguientes experimentos:

- 1). Evaluación de parámetros de viabilidad celular, mediante: Medida de la actividad metabólica utilizando el ensayo de reducción del MTT de las células HepG2, HuH6, HuH7, Hep3B y Chang tratadas con AZA y/o 3-MA y/o IGF-1 durante diferentes tiempos.
- 2). Caracterización de la autofagia, mediante los siguientes experimentos:
  - a. Valoración de los niveles de LC-3 después del tratamiento con AZA, a distintos tiempos, en diferentes líneas celulares humanas (HepG2, HuH6, HuH7, Hep3B, Chang) y en hepatocitos inmortalizados de ratones neonatos (normales y S6K1(-/-)).



- b. Cuantificación del número de células autofágicas tras el tratamiento con AZA de las células HepG2 mediante la tinción de las vesículas autofágicas con naranja de acridina y cuantificación de las mismas mediante citometría de flujo.
  - c. Evaluación de la autofagia inducida por AZA tras la disminución de los niveles de expresión génica de ATG-5 mediante el uso de la técnica de siRNA.
- 3). Estudio de los mecanismos de señalización implicados. Para identificar la ruta de señalización principal por la que la azatioprina ejerce los efectos autofágicos, se utilizaron diferentes inhibidores específicos: PD098059 (inhibidor de la MEK), SB203580 (inhibidor de p38) y rapamicina (inhibidor de mTOR). Después de los correspondientes co-tratamientos se estudió la autofagia por expresión de LC-3 y la fosforilación de p70S6K y mTOR por inmunoblot.

Una vez identificada la cascada de señalización a través de la cual actúa la azatioprina, se analizaron otros aspectos de dicha cascada:

- a. Medida de los niveles de Ras-GTP mediante un experimento de “pull-down”, utilizando la proteína de fusión raf-1-GST, de los extractos proteicos de las células HepG2 tratadas con AZA.
- b. Valoración de la expresión de los niveles de ARN mensajero de jun y fos usando la técnica de RT-qPCR en tiempo real en las células HepG2 tratadas con AZA.
- c. Inmunoprecipitación de ERK y western blot de ERK y de TSC-2 para medir el acoplamiento de ERK con TSC-2 tras el tratamiento de las células HepG2 con AZA.
- d. Medida de la actividad enzimática de la proteína p70S6K tras el tratamiento de las células HepG2 con AZA, usando [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP radiactivo y el péptido S6 como sustratos.

Se ha descrito previamente que la activación sostenida de la enzima p70S6K puede producir la fosforilación en el residuo Ser307 del IRS-1 causando su degradación y por lo tanto se decidió estudiar dicha cascada de señalización tras el tratamiento con AZA. Para ello se realizaron los siguientes experimentos:

- a. Medida de los niveles de las proteínas IRS-1, IGF-1R- $\beta$ , AKT, p70S6K, FOXO1, así como del estado de fosforilación de las mismas en células HepG2 pretratadas con AZA y estimuladas con IGF-1.
- b. Análisis de la asociación de IRS-1/p85 mediante inmunoprecipitación de IRS-1 y western blot de IRS-1 y de p85 (subunidad de reguladora de la PI3K), tras el tratamiento de las células HepG2 con AZA.

Para analizar la participación de la autofagia estimulada por AZA en la desensibilización de las células HepG2 al IGF-1, se repitieron los experimentos en presencia de 3-metiladenina (inhibidor de la enzima PI3K de clase III) y bafilomicina A1 (inhibidor de la actividad ATPasa de la bomba de protones del lisosoma).

4) Para estudiar el efecto de la autofagia sobre el ciclo celular, se realizaron los siguientes experimentos en células tratadas con azatioprina y/o bafilomicina A1:

- a. Estudio del ciclo celular por citometría de flujo mediante tinción con yoduro de propidio.
- b. Valoración de los niveles de distintas proteínas reguladoras del ciclo celular.
- c. Estudio de la senescencia celular mediante la valoración de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

La autofagia puede servir para proteger la célula del estrés provocado por la azatioprina porque favorece la degradación de los orgánulos dañados, el bloqueo de dicho proceso mediante bafilomicina A1 podría provocar la muerte celular. Para comprobar esta hipótesis se trataron las células HepG2 con ambas moléculas y se estudio la muerte celular mediante las siguientes técnicas:

- a. Medida de la actividad metabólica por MTT en las células HepG2 desprendidas del cultivo celular al tratar con AZA y bafilomicina A1.
- b. Medida de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) al medio de cultivo celular tras el tratamiento con AZA y/o bafilomicina A1.
- c. Análisis de la fragmentación de la proteína nuclear PARP de las células HepG2 tras el tratamiento con AZA y/o bafilomicina A1.
- d. Análisis por citometría de flujo de la apoptosis de las células HepG2 después del tratamiento con AZA y/o bafilomicina A1.

**Resultados y discusión:**

Como se ha comentado en la introducción de este capítulo, el hepatoblastoma es un tipo de cáncer dependiente de los niveles de IGF-1 [Kurmasheva RT et al, 2006], [Moore T et al, 2011], [Shin E et al, 2011], [Adesina AM et al, 2009] por lo que cualquier medicamento que genere resistencia al IGF-1 puede ser de utilidad en el tratamiento de este tipo de tumores. En el capítulo anterior demostramos que la azatioprina produce autofagia en células HepG2 (modelo de hepatoblastoma humano) a través de la ruta de señalización de la proteína p70S6K. Dicha enzima a su vez favorece la degradación del IRS-1 dando lugar a resistencia al IGF-1. En este trabajo se ha estudiado el efecto de la azatioprina sobre la proliferación de las células HepG2 tratadas con IGF-1, los resultados se han comparado con el obtenido en otras líneas celulares procedentes de diferentes tipos de cánceres hepáticos. El efecto de la azatioprina en las células HepG2 es diferente al producido en las demás líneas celulares. En células HepG2, la azatioprina activó la autofagia por un mecanismo dependiente de ERK/p70S6K mientras que en el resto de las células estudiadas no lo hizo (Figura 1). Se demostró la participación del gen ATG-5 en los efectos de la azatioprina, ya que su anulación mediante siRNA en las HepG2 inhibió el flujo autofágico activado por el fármaco caracterizado por la transformación de LC3-I en LC3-II. La activación de la autofagia también quedó demostrada mediante la aparición de vesículas autofágicas observadas mediante microscopía confocal de fluorescencia utilizando naranja de acridina y anticuerpos contra LC-3 (figura S1).

En las células HepG2 a diferencia del resto de las líneas estudiadas, la azatioprina fue capaz de activar la ruta de señalización de Ras/MEK/ERK/TSC-2/mTOR/p70S6K. La inhibición de MEK1/2 con PD098059 provocó una disminución de la autofagia y de la fosforilación p70S6K, lo que sugiere la correlación de ambos efectos. El grupo de Kinsella ha demostrado previamente la importancia de la enzima p70S6K en la activación de la autofagia por 6-tioguanina [Zeng X et al, 2008]. La activación de la p70S6K se debe a la estimulación de Ras y no de PI3K al activarse tan solo la primera en presencia de azatioprina. La presencia del fármaco provocó un aumento rápido de ras unido a GTP tal y como lo demuestran los experimentos de *pull-down* de Ras, dicho efecto fue superior al observado en presencia de GTP $\gamma$ S (control positivo). Los resultados de este experimento se correlacionaron con la fosforilación de

la proteína ERK, así como con la activación de la transcripción de los genes fos y jun de la familia AP1 [Xu C et al, 2006] lo que confirma la activación de esta ruta. Este proceso se inhibe por N-acetilcisteína lo que sugiere la participación de radicales libres del oxígeno. Nuestros resultados indican que la activación de ERK por azatioprina es un proceso rápido y sostenido en el tiempo, ya que observamos un efecto a partir de los 15 minutos y el máximo de fosforilación a las 12 horas. Se ha descrito que la activación de ERK produce la inhibición del supresor de tumores TSC-2, el cual estimula la actividad GTPasa de la proteína Rheb, con lo que tras el tratamiento con AZA no se produce la degradación del GTP y Rheb permanece activo. Una de las principales funciones de Rheb es promover la activación de mTOR por fosforilación en el residuo de Ser2448 [Ma L et al, 2005]. Una vez activado mTOR, esta es capaz de fosforilar a otros sustratos cuando está formando parte del complejo mTORC, uno de estos sustratos es la proteína p70S6K. Como consecuencia de la activación de el anterior proceso se produce la fosforilación de p70S6K en el resto de Thr389 y en los residuos Thr421 y Ser414, lo cual provoca un aumento de la activación enzimática tal y como se observó mediante un ensayo de actividad utilizando  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  y el sustrato S6. La enzima mTOR puede participar en la formación de dos complejos el mTORC1 y el mTORC2, nuestros resultados sugieren que la azatioprina regula la formación de mTORC2 ya que esta constituido por Rictor el cual es insensible a la rapamicina. Esta hipótesis está basada en el hecho de que el cotratamiento de las células HepG2 con rapamicina no inhibió los efectos de la azatioprina sobre p70S6K.

Diferentes autores han demostrado que la activación de la proteína p70S6K puede tener diferentes funciones. Su activación aguda por mitógenos y por hormonas como la insulina produce un aumento de la síntesis proteica por fosforilación de enzimas ribosomales y por lo tanto muy importante en la traducción del ARNm, en el crecimiento de la célula y en la proliferación celular. Sin embargo si se produce una activación sostenida en el tiempo (o activación crónica) puede dar lugar a la desensibilización a insulina y a mitógenos como el IGF-1. Dicho proceso se produce como consecuencia de la degradación del IRS-1. La sobreactivación de p70S6K da lugar a la fosforilación del residuo de Ser307 en el IRS-1 lo que favorece los procesos de ubiquitinación y posterior degradación proteolítica por el proteasoma [Haruta T et al, 2000]. Por lo tanto el tratamiento de las células HepG2 con azatioprina produjo la

activación sostenida de la enzima p70S6K lo que condujo al aumento en la degradación del IRS-1, lo que afectó a la cascada de señalización del IGF-1. Dicha hormona actúa a través del receptor de membrana IGF-1R, el cual está conectado a la proteína adaptadora IRS-1, es previsible por lo tanto que la azatioprina afecte a dicha conexión. Nuestros resultados muestran que la azatioprina provocó la disminución de la fosforilación en tirosina del receptor de IGF-1 tras la activación con IGF-1, así como la disminución de la asociación del IRS-1 a la p85, subunidad reguladora de la PI3K. Dicho efecto se trasladó a otros componentes de la cascada como por ejemplo a AKT, FOXO1 y a la propia p70S6K activada por IGF-1.

Como consecuencia del bloqueo de dicha cascada por azatioprina, la enzima AKT no se activa por fosforilación en la Ser473, ni en la Thr308 por lo que su efector FOXO1 permanece desfosforilado, no se degrada por la vía proteosomal y permanecerá en el núcleo asociado al ADN, ejerciendo su acción inhibidora del ciclo celular [Foulstone E et al, 2005], [Huang H et al, 2007], [Matsuzaki H et al, 2003]. Como consecuencia la azatioprina debería ser capaz de bloquear la señales mitogénicas del IGF-1 sobre las células HepG2. Para demostrar dicha hipótesis, las células HepG2 fueron tratadas durante varios días con azatioprina obteniéndose la inhibición del crecimiento celular en presencia de IGF-1, los resultados obtenidos mediante citometría de flujo demostraron que la azatioprina impide la realización completa del ciclo celular por lo que se acumulan en la fase G2/M. Los cambios observados en el ciclo celular tras el tratamiento con azatioprina son compatibles con la aparición de senescencia celular, lo que se ve confirmado con el aumento de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa y el aumento de la expresión de p21 [Park SH et al, 2011], [Kim TR et al, 2010], características moleculares de dicho proceso celular, junto con el acortamiento de los telómeros. El proceso senescente se puede dar porque disminuyan los telómeros, se altere el ADN, activándose ATM y p53 dando lugar a la sobreexpresión de p21 y parada del ciclo celular en G1 [Herbig U et al, 2004], o bien tal y como han demostrado Young y colaboradores, porque se active la autofagia, lo que provoca la parada de ciclo celular y aparición de senescencia [Young AR et al, 2009]. Este parece ser el caso de las células HepG2 tratadas con azatioprina, ya que cuando cotratamos con un inhibidor de la autofagia como bafilomicina A1 se inhibe completamente la senescencia aunque las células entran en un proceso de apoptosis tal y como se demuestra por el número de

células que se desprenden de la placa de cultivo, por la fragmentación de PARP, por los experimentos de citometría de flujo, así como con disminución de proteínas que activan el ciclo celular como Rb, E2F y Ciclina D. Nuestros resultados sugieren que la azatioprina activa la autofagia en las células HepG2, lo cual conduce a la parada del ciclo celular y senescencia, evitando la muerte por apoptosis, la cual se desencadena cuando se inhibe la autofagia por bafilomicina A1.

La autofagia desencadenada por lo azatioprina no se debió a la activación de la enzima PI3K de clase III, ya que la molécula 3-metiladenina un inhibidor específico de dicha enzima no revirtió el efecto del fármaco. Nuestros resultados nos permiten sugerir que se debe a la inhibición de la cascada de señalización de la enzima PI3K de clase I, la cual media los efectos del IGF-1 y de otros factores de crecimiento que pudieran producir las células HepG2 con un modo de acción autocrino. En este sentido, se ha descrito que los inhibidores de PI3K de clase I, como LY294002 producen autofagia en líneas celulares de cáncer gástrico [Xing C et al, 2008]. Recientemente, se ha observado que el tratamiento de fibroblastos humanos en cultivo con IGF-1 reduce la autofagia, la cual se activa por inhibición de la enzima mTOR por rapamicina [Bitto A et al, 2010], lo que pone de manifiesto claramente el papel inhibidor de la autofagia que juega la cascada de señalización del IGF-1. Es por ello que podemos sugerir que el efecto activador de la azatioprina sobre la autofagia, se debe a la inhibición de dicha cascada de señalización. Aunque no podemos descartar al no haber sido estudiado por nosotros, la posibilidad sugerida previamente según la cual una activación sostenida de ERK produciría la sobreexpresión de ATG-7 y/o de beclina-1 lo que llevaría a la activación de la autofagia [Gong K et al, 2012], [Wang J et al, 2009].

### **Conclusiones:**

Los presentes resultados permiten concluir de que la azatioprina es un fármaco que produce autofagia sobre las células HepG2, procedentes de un hepatoblastoma humano, mediante la activación sostenida de la cascada Ras/ERK/TSC-2/mTOR/p70S6K, la cual da lugar a la degradación de IRS-1 y por lo tanto a la desensibilización de la célula a los factores de crecimiento como el IGF-1. Dado el papel del IGF-1, se sugiere que el fármaco produce parada de ciclo celular y senescencia aunque no induce la apoptosis. Sin embargo, cuando paralelamente se

inhibe la autofagia en sus últimas etapas con bafilomicina A1, se produce el acúmulo del material contenido en los autofagolisosomas y se desencadena la apoptosis celular. Este mecanismo no es común a otras células tumorales de origen hepático por lo que su posible aplicación estaría restringido a células cancerosas en las que se active p70S6K y sean dependientes de los factores de señalización que actúan a través de IRS-1.

Los presentes resultados han dado lugar al manuscrito **“Azathioprine desensitizes hepatoblastoma cells to insulin-like growth factor 1 and causes apoptosis when it is combined with bafilomycin A1”** el cual ha sido enviado a la revista **“Cancer Research”**.





## Azathioprine desensitizes hepatoblastoma cells to insulin-like growth factor 1 and causes apoptosis when it is combined with bafilomycin A1

Borja Hernández-Breijo<sup>1</sup>, Jorge Monserrat<sup>2</sup>, Irene D. Román<sup>1</sup>, Águeda González-Rodríguez<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno<sup>3</sup>, M<sup>a</sup> Val T. Lobo<sup>4</sup>, Ángela M. Valverde<sup>3</sup>, Javier P Gisbert<sup>5</sup>, Luis G. Guijarro<sup>1</sup>

### Abstract

Hepatoblastoma is a primary liver cancer that affects children, although it only accounts for 1% of all pediatric cancers; however its incidence is increasing because it is being associated with preterm birth. This tumor is very sensitive to insulin-like growth factor 1 (IGF-1). In this paper we show that azathioprine (AZA) is capable of inhibiting IGF1- mediated signaling cascade in HepG2 cells and in a lesser extent in HuH6 (experimental models of hepatoblastoma), without significant effects on HuH7 (experimental model of hepatocellular carcinoma) and Chang liver cells (a non-malignant cellular model). The results were compared with the hepatocarcinoma cell line Hep3B. The effect of AZA in HepG2 cells is due to activation of ras/ERK which associates with TSC-2, leading to activation of mTOR/p70S6K in a sustained manner. The p70S6K enzyme, phosphorylates IRS-1 in serine 307 which leads to the uncoupling between IRS-1 and p85 (the regulatory subunit of PI3K) and therefore causing the lack of response of HepG2 to IGF-1. As a consequence, proliferation induced by IGF-1 is inhibited and autophagy is increased leading to senescence of HepG2 cells. Our results suggest that the autophagic process induced by AZA activates senescence and protects HepG2 cells from programmed cell death since when autophagy is inhibited by bafilomycin A1, senescence is also inhibited and cells die by apoptosis. In the other cells (HuH6, HuH7, Hep3B, and Chang) studied AZA was unable to activate autophagy, therefore it is suggested that the mechanism of inhibition of proliferation, if any, is independent of autophagy. Our data suggest that the association of AZA with bafilomycin A1 can be useful in the treatment of certain cases of hepatoblastoma. Cancer Res; ©2013 AACR.

### Introduction

Primary hepatic malignancies are rare in children, hepatoblastoma being the most common of these, accounting for 1% of all pediatric cancers (1). Hepatoblastoma has been associated with Beckwith-Wiedemann syndrome and APC mutations (familial adenomatous polyposis). Moreover, different reports from USA and Japan have suggested that the incidence of hepatoblastoma is enhanced in infants with extremely low birth weight (2). The treatment of hepatoblastoma is based on systemic chemotherapy and/or surgery. There are two different approaches of their management: in Europe, physicians use chemotherapy followed by surgical resection

whereas in USA chemotherapy is employed after surgery (3). Chemotherapy includes combinations such as cisplatin with 5-fluorouracil, vincristine and cyclophosphamide or cisplatin with doxorubicin; however, the most usual therapy is the combination of cisplatin/5-fluorouracil/vincristine (4). For children with unresectable tumors, liver transplantation is a good option which has improved the cure options of these patients (5). Treatments like transarterial chemoembolization (TACE) or local ablation by radiofrequency (RFA) have shown good results for hepatoblastoma patients (6, 7).

**Authors' Affiliation:** <sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Spain; <sup>2</sup>Departamento de Medicina y Especialidades médicas, Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Spain; <sup>3</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC/UAM), Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, 28029, Madrid, Spain; <sup>4</sup>Departamento de Ciencias Biomédicas I, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria

(IRYCIS), Universidad de Alcalá, 28871, Alcalá de Henares, Spain; <sup>5</sup>Unidad de Gastroenterología, Hospital Universitario de La Princesa, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa and Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), 28006 Madrid, Spain.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Authors:** Luis G. Guijarro, Departamento de Fisiología, Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá. E-28871, Alcalá de Henares, Spain. Phone: +34918854865, Email: [luis\\_guijarro@telefonica.net](mailto:luis_guijarro@telefonica.net)

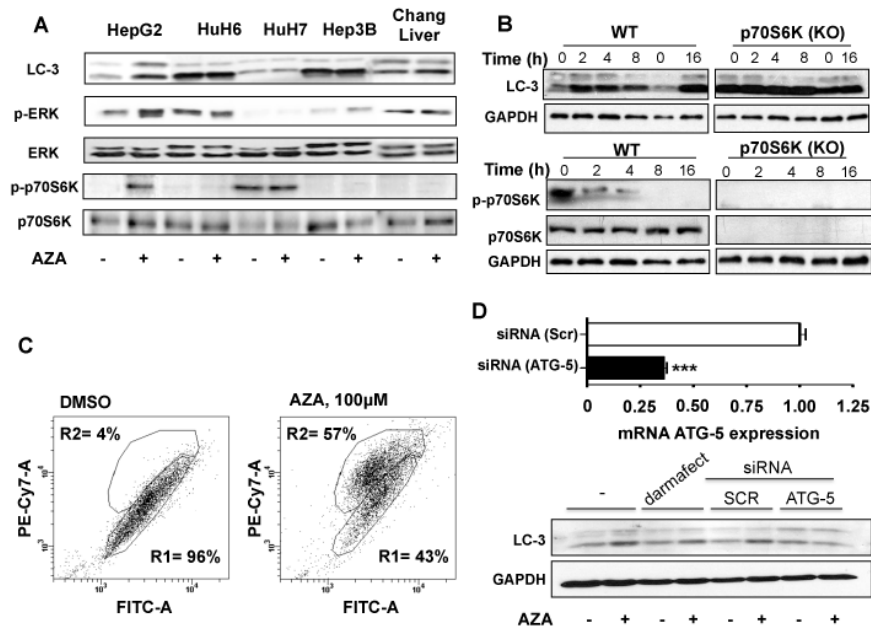


Figure 1. Characterization of autophagy induced by AZA in hepatic cells. Western blots of LC3, p-ERK, ERK, p-p70S6K (Thr421/Ser424), p70S6K and GAPDH levels after AZA (50µM) treatment in HepG2, HuH7, Chang Liver, HuH6 and Hep3B cells during 42h (A), or mouse hepatocytes wild type (WT) or deficient in p70S6K (KO) treated with AZA (50µM) at different times (B). (C) HepG2 cells stained with acridine orange after treatment for 42 h with AZA (100 µM) and quantified by flow cytometry. (D) HepG2 cells were transfected with ATG-5 or Scrambled (Scr) siRNA. Atg5 mRNA levels assessed by real-time polymerase chain reactions and LC-3 levels are shown. All of the data shown are representative of at least three experiments

However, there are a high percentage of children (30%) that did not respond to these treatments (8). Recently, it has been found that overexpression of IGF-1 is related with poor prognosis of patients with human hepatoblastoma, which is characterized by metastasis and tumor recurrence (9). Moreover, transcriptomic and genomic analysis have shown that IGF-2 is specifically overexpressed in hepatoblastoma in relationship to hepatocarcinoma (10). Both hormones, IGF-1 and IGF-2, activate the IGF-1 receptor (IGF-1R) (11) in a signaling cascade that includes the IRS (insulin receptor substrate) family. After binding of IGFs to the corresponding receptors, the IRSs are recruited and subsequently phosphorylated in tyrosine residues, which lead to activation of the PI3K/AKT cascade (11). Among them, IGF-1R, IGF-2R and IRS-1 are overexpressed in human hepatocarcinoma in 40%, 100%, and 80% of the patients, respectively (12). It has been demonstrated that IGF-1 has a paracrine/autocrine effect in hepatocarcinoma by activating the MAPK pathway, which leads to increased expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes (13) that seem to be essential for tumor progression (13). Due to these facts, the IGF-1 receptor has been considered as a therapeutic target for the treatment of hepatocarcinoma (14). Nowadays, there are different therapies against this target under evaluation in clinical trials such as antibodies against IGF-1R (i.e. Cixutumumab, AVE1642) and IGF-1R inhibitor (i.e. OSI-906) (14, 15). Azathioprine (AZA) is an immunosuppressant that belongs to thiopurines family and it is widely used for the treatment of autoimmune diseases and for

transplants. Recently, we have demonstrated that AZA in combination with buthionine sulfoximine (BSO) produces death of tumor cell lines derived from liver and colon (16). In the same way, we observed reduction of the volume of the tumors obtained in a murine xenograft with HepG2 after treatment with pharmacological concentrations of AZA plus BSO (16).

The HepG2 cell line has been validated as an *in vitro* model for the study of hepatoblastoma, which is highly dependent from IGF-1 in cell cycle progression (17) or to survive to pharmacological therapy (18). Moreover, IGF-1 is an important factor in the restoration of liver mass after hepatectomy in rats (19), which demonstrated that this hormone regulates the proliferation of normal and cancerous processes of the liver. For all these reasons, it would be very useful to know whether AZA inhibits the IGF-1 signaling cascade in experimental models of hepatoblastoma and hepatocarcinoma and the molecular mechanism involved in this effect.

## Materials and Methods

### Materials

AZA was a gift from UCB Pharma S.A. (Madrid, Spain). Antibodies against p-p70S6K (Ser389), p-mTOR (Ser2448), p-AKT (Thr308), TSC-2, Ras, IGF-1R-β, pYIGF-1R, IRS-1, p-IRS-1 (Ser307), cyclin D1, Cyclin E, FOXO1 and p-FOXO1 were obtained from Cell Signalling Technology Inc. (Beverly, Massachusetts, USA). Antibodies against ERK, p-p70S6K (Thr421/Ser424), p70S6K, GAPDH, p-AKT (Ser473), AKT, E2F, CDK4, c-myc and PI3K(P85)α were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA).

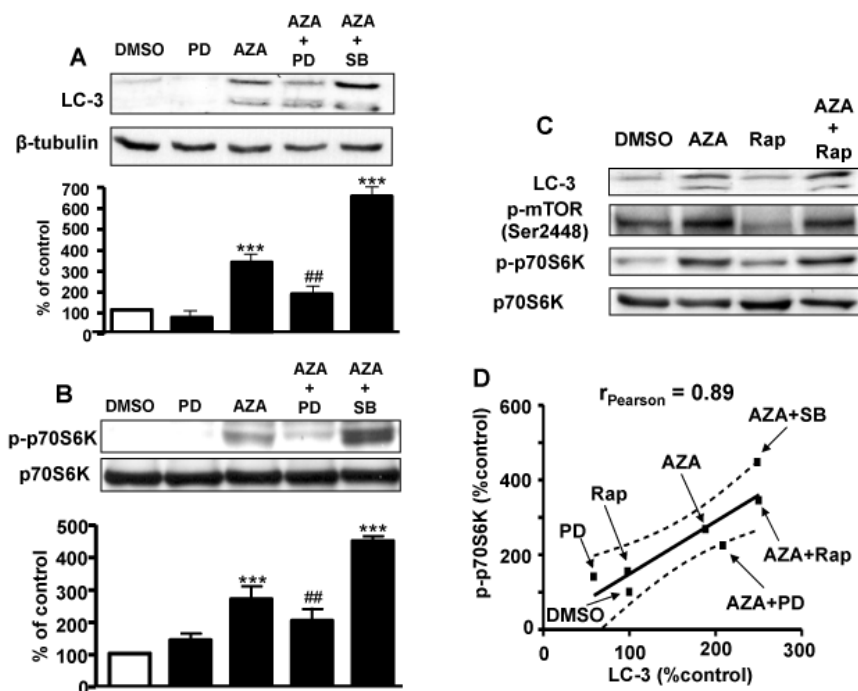


Figure 2. Effect of different kinase inhibitors in autophagy and in signaling pathways stimulated by AZA. (A, B) LC-3, p-p70S6K (Thr421/Ser424), p70S6K and  $\beta$ -tubulin levels measured by western blot in HepG2 cells treated with DMSO, AZA (25  $\mu$ M), PD098059 (20  $\mu$ M), AZA plus PD098059 (20  $\mu$ M), or AZA plus SB203580 (20  $\mu$ M) during 12h. Significant differences were analyzed by ANOVA with the Bonferroni post test. (\*\*\*) p value < 0.001, every treatment was compared with control (DMSO). (##) p value < 0.01, AZA was compared with AZA plus PD. (C) LC-3, p-mTOR (Ser2448), p-p70S6K (Thr421/Ser424) and p70S6K levels measured by western blot in HepG2 cells treated with DMSO, AZA (50  $\mu$ M) and/or rapamycin (30 nM) during 12h. (D) Correlation between levels of LC-3 and p-p70S6K (Thr421/Ser424) of the samples from the HepG2 cell treated in the conditions described for A, B and C. Correlation was analyzed by linear regression. (c.i = 95%;  $r_{\text{Pearson}} = 0.89$ ). Western blots shown are representative of at least three experiments.

Antibodies against LC3,  $\beta$ -tubulin and p-ERK were obtained from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). Antibody against PARP was obtained from BD Biosciences Pharmingen (Madrid, Spain). Antibodies against p16, p21 and Rb were obtained from Millipore (Madrid, Spain). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), 3-methyladenine (3-MA), IGF-1, bafilomycin A1, GTPyS, GDP, 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside and dimethylsulfoxide were obtained from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). The inhibitors SB203580, PD98059 and Rapamycin were obtained from Calbiochem Merck Chemicals Ltd. (Nottingham, UK). Acridine orange was obtained from Invitrogen (Oregon, USA). Prot A/G-plus was obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). All other reagents were of the highest grade of purity available.

#### Cell Culture

HepG2, HuH7, HuH6, Hep3B and Chang Liver cells were obtained from ATCC and grown in MEM supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic solution and maintained in an incubator at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Immortalized hepatocyte cell lines were generated from mice livers of 3-5 day-old wild-type (p70S6K1+/+) and deficient in p70S6K (p70S6K1-/-) as previously described (20).

#### Metabolic Activity

The MTT reduction assay was performed as

described previously (21).

#### Lactate dehydrogenase (LDH) release assay

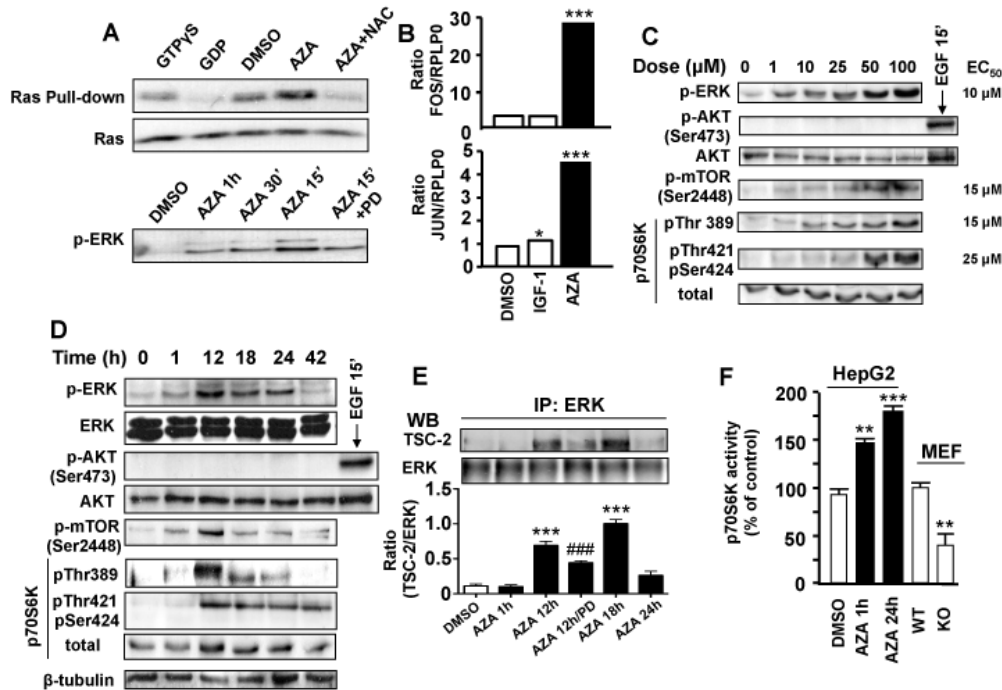
Assay was performed as described previously (17).

#### Western Blotting

Total cellular protein was extracted as described previously (18). Protein concentration was determined by the Bradford method and equal amount of total protein were loaded onto SDS-PAGE gels and transferred to nitrocellulose membranes overnight at 25 V and 4°C. The immunoblots were developed as previously described (18).

#### Immunoprecipitation

After treatment, HepG2 cells were disrupted with lysis buffer. IRS-1, p70S6K or ERK were immunoprecipitated overnight at 4°C from 500  $\mu$ g of total proteins using 2  $\mu$ g of anti-IRS-1, anti-p70S6K or anti-ERK rabbit polyclonal antibodies. To this mixture, we added 30  $\mu$ l of protein A/G plus-Agarose Immunoprecipitation Reagent (Santacruz biotechnology INC, Santa Cruz, CA), and incubation was continued for a further 2h. The beads were washed 4 times in wash buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 5 mM, EGTA 1 mM). Precipitated samples were boiled for 5 minutes in 2X Laemmli loading buffer and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting.



**Figure 3.** Activation of Ras/ERK/m-TOR/p70S6K pathway by AZA. (A) Ras Pull-down assay of HepG2 cells treated with DMSO, AZA (50µM) or NAC (1.5mM) during 30min. GTPγS and GDP were used as positive and negative controls, respectively. Also, p-ERK was analyzed by western blot of HepG2 cells treated with DMSO, PD098059 (20µM) and/or AZA (50µM) at different times. (B) Analysis of fos and jun mRNA expression by qRT-PCR. It was carried out in HepG2 cells treated with DMSO, AZA (50µM) or IGF-1 (100nM). Results were normalized with RPLP0. Significant differences were analyzed by ANOVA with the Bonferroni post-test. (\*) p value < 0.05, (\*\*\*) p value < 0.001, every treatment was compared with control (DMSO). p-ERK, ERK, p-AKT (Ser473), AKT, p-mTOR (Ser2448), p-p70S6K (Thr389), p-p70S6K (Thr421/Ser424), p70S6K and β-tubulin levels of HepG2 cells measured by western blot after treatment with different doses of AZA during 12h (C) and after a kinetic study with AZA (50µM) (D). (E) Immunoprecipitation of ERK and western blot of TSC-2 and ERK in HepG2 cells treated with DMSO, AZA (50µM) and AZA (50µM) plus PD098059 (20µM) at different times. Ratio TSC-2/ERK was evaluated. Significant differences were analyzed by ANOVA with the Bonferroni post test. (\*\*\*) p value < 0.001, every treatment was compared with control (DMSO). (###) p value < 0.001, AZA was compared with AZA plus PD. (F) p70S6K activity assay was performed in HepG2 cells treated with DMSO or AZA (50µM) during 1h and 24h. P70S6K activity in HepG2 cells was compared with wild-type (WT) or with p70S6K1-deficient (KO) mouse hepatocytes (MEF). Significant differences with respect to control (DMSO) were analyzed by ANOVA test. Significance levels: p value < 0.01 (\*\*), p value < 0.001 (\*\*\*). All of the data shown are representative of at least three experiments.

**Ras activation assay**

Ras-GTP was quantified using a non-radioactive Ras activation assay kit (Millipore, Madrid, Spain) according to the manufacturer’s instructions. Ras-GTP from total cell lysates was pulled down using raf-1-GST fusion protein, containing the human ras-Binding Domain (RBD, residues 1–149) of raf-1, conjugated on agarose beads. After the pull down of ras, the resulting proteins were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting with the anti-ras antibody.

**Study of cell cycle, apoptosis and autophagy by flow cytometry**

Cell cycle assay was carried out by permeabilization of the cells with NP40 (0.5 mg/mL) and then treated with RNase (0.5 mg/mL) during 30 min. 25 µL of propidium iodide were added followed by flow cytometry analysis. Apoptotic cells were detected using FITC conjugated Annexin V (Invitrogen, Barcelona, Spain) and propidium iodide (PI). Cells were washed twice with cold PBS and resuspended in an Annexin V-binding buffer containing 10 mmol/L 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 140 mmol/L NaCl, and 250 mmol/L CaCl2 at a concentration of 1 x 10<sup>6</sup> cells/mL. 5 µL of Annexin

V-FITC and 10 µL of PI were added to the suspension into a 5 mL culture tube. The tube was incubated for 15 min in the dark at room temperature and cells were analyzed by flow cytometry.

To study autophagy, cells were incubated with acridine orange (1µM) during 17 min and then analyzed by flow cytometry.

**Real time RT-PCR (qPCR)**

Total RNA was isolated from the HepG2 cells using RNeasy kit (Qiagen, Madrid, Spain) in accordance with the manufacturer’s instructions. First-strand cDNA was prepared from total RNA using PrimeScript RT reagent kit (Takara Biotechnology, Japan). Real-time PCR was conducted in a 7500 fast-Real time PCR system and SYBR Green PCR Master Mix was used (Applied Biosystems, Madrid, Spain). The sequences for human primers were obtained from Invitrogen (Madrid, Spain): v-fos forward primer 5'-CGGGCTTCAACGAGACTA; v-fos reverse primer 5'-GGTCCGTGAGAAGTCTCTG. v-jun forward primer 5'-CCCCAGCTATCTATATGGAA; v-jun reverse primer 5'-GCTGTCCCTCTCACTGCAA. RPLP0 forward primer 5'-CCTCATATCCGGGGGAATGTG; RPLP0 reverse primer 5'-GGCAGCAGCTGGCACCTTATT.

ATG-5 forward primer 5'-TTTGCATCACCTCTGCTTTC; ATG-5 reverse primer 5'-TAGGCCAAAGGTTTCAGCTT. 18S forward primer 5'-GGACACGGACAGGATTGACA; 18S reverse primer 5'-ACCCACGGAATCGAGAAAAGA.

#### ATG-5 siRNA transfection

HepG2 cells were seeded at  $3 \times 10^5$  cells/well on 6-well plate the day before transfection. Then cells were transfected in 2ml EMEM containing 10% fetal bovine serum with 1 mg/mL Darmafect 4 (Dharmacon, USA) and with 25 nM ATG-5 ON-TARGETplus SMARTpool siRNA (Dharmacon, USA) or control scrambled RNA according to the manufacturer's protocols. At 48 h after transfection, the medium was removed and replaced for EMEM without fetal bovine serum and cells were treated.

The sequences from ATG-5 ON-TARGETplus SMARTpool siRNA were the following: GGCAUUAUCCAAUUGGUUU, GCAGAACCAUACUUAUUUGC, UGACAGAUUUGACCAGUUU, ACAAAGAUGUGCUUCGAGA.

cold MeOH for 2 min. Then cells were washed with PBS and permeabilized with Triton X-100 (0.5%) during 10 min and blocked for 10 min with donkey serum (3%). Cells were then incubated 1h with mouse anti-human LC3 (Nanotools, Teningen, Germany) diluted with blocking buffer to 1:200. The next day, after washing with PBS, the cells were incubated with secondary antibody (1:400) conjugated to Alexa 488 (Invitrogen) for 1h at room temperature. Coverslips were mounted using Fluoroshield with DAPI (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and visualized in a confocal microscopy.

#### Electron microscopy

Cells were fixed for 2h at 4°C in 3% glutaraldehyde Millonig buffer (Leica, Barcelona, Spain), washed and fixed again in 1% OsO<sub>4</sub>, dehydrated with acetone and incubated with uranyl acetate for 15h at 4°C. Then cells were embedded in araldite. Electron microscopy was performed with a Zeiss EM-109M10 transmission electron microscope, at 90 kV, on ultrathin sections (80 nm thick) stained with toluidine blue and lead citrate.

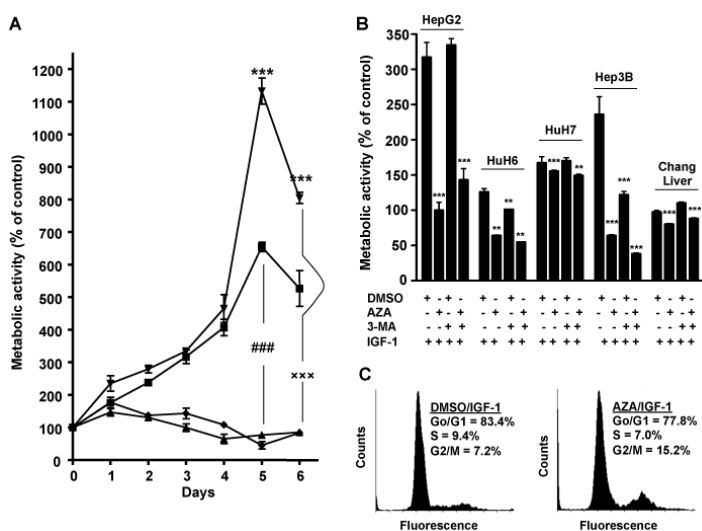


Figure 4. Effect of AZA treatment in hepatoma cell lines. (A) Metabolic activity in HepG2 cells treated with DMSO (control), AZA (50 $\mu$ M), 3-MA (0.5nM) and/or IGF-1 (10nM) measured on different days. DMSO/IGF1 (■), AZA/IGF1 (▲), 3-MA/DMSO/IGF1 (▼), 3-MA/AZA/IGF1 (◆). Significant differences were analyzed by ANOVA. Significance levels were: p value < 0.001 (\*\*\*) (■ vs. ▼), p value < 0.001 (###) (■ vs. ▲ or ■ vs. ◆), p value < 0.001 (xxx) (▼ vs. ◆ or ▼ vs. ▲). (B) Metabolic activity measured in HepG2, HuH7, Chang liver, HuH6 and Hep3B cells after 4 days of treatment with DMSO (control), AZA (50 $\mu$ M), 3-MA (0.5nM) and/or IGF-1 (10nM). Significance levels with respect to control (DMSO/IGF-1) were analyzed by ANOVA. Significance levels: p value < 0.01 (\*\*), p value < 0.001 (\*\*\*). (C) Cellular cycle analysis by flow cytometry of HepG2 cells stained by propidium iodide. Cells were treated with DMSO or AZA (50 $\mu$ M) and IGF-1 (10nM) during 72h. All of the data shown are representative of at least three experiments.

#### p70S6K activity assay

p70S6K activity was measured using the p70S6 Kinase Assay Kit (Upstate, Lake Placid, NY, USA). Briefly, total cell lysates were prepared from HepG2 cells treated with AZA. Cells were harvested at the times indicated and lysed as previously described (18). After Immunoprecipitation, p70S6K activity assay was performed according to the instructions of the Kit. We measured the activity using [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP (Perkin Elmer Inc, Boston, MA, USA) and scintillation fluid to detect the dpm. The radiolabeled proteins were counted in a liquid scintillation counter. Each sample was tested in duplicate.

#### Immunofluorescence

Cells cultured on coverslips were incubated with acridine orange during 17 min and after cells were visualized using fluorescence microscopy. Alternatively, cells were fixed with paraformaldehyde (4%) (w:v) for 15 min and with

#### Senescence-associated (SA)- $\beta$ -galactosidase (Gal) staining

After the treatments, cells were washed with PBS (pH 7.2-7.4) and fixed with 3% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature. Then, cells were washed with PBS and incubated overnight at 37 °C (no CO<sub>2</sub>) with fresh senescence-associated (SA)- $\beta$ -galactosidase stain solution [1 mg/ml X-Gal, 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 40 mM citric acid/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 6.0, 150 mM NaCl, and 2 mM MgCl<sub>2</sub>] (22). SA- $\beta$ -galactosidase positive cells were detected and counted by light microscopy.

#### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism package (GraphPad Software Inc., CA, USA). Values are reported as mean  $\pm$  SEM and evaluated by the ANOVA statistical test. The statistical significance was set at p < 0.05.



Results

**Characterization of autophagy in different liver cell lines**

Five hepatoma cell lines (HepG2, HuH6, HuH7, Hep3B and Chang Liver) were treated with AZA (50 μM) or DMSO (0.2%) during 12h; this thiopurine produced an increase of LC-3 conversion in HepG2, but no effect was observed neither in HuH6, HuH7, Hep3B nor Chang Liver cells (Figure 1A). In parallel, we studied activation of ERK and p70S6K; only HepG2 cells showed an increase in the phosphorylation of both enzymes after treatment with AZA. This result suggests that in HepG2, autophagy is activated by AZA through the ERK/p70S6K signaling cascade (Figure 1A). To verify the role of p70S6K in AZA-induced autophagy in non-tumoral liver cells, immortalized neonatal hepatocytes (p70S6K1+/+ or p70S6K1-/-) were treated with this compound (50μM) at different time-periods (0h, 2h, 4h, 8h and 16h). In wild-type hepatocytes, AZA (50 μM) produced an inhibition of p70S6K along with an increase of autophagy (Figure 1B). This effect was dependent on the time of incubation with the drug. The reciprocal relationship between p70S6K and autophagy in wild-type mouse hepatocytes was verified in hepatocytes lacking p70S6K (S6K1-/-). In these cells, autophagy was very high and AZA did not produce any further effect (Figure 1B). To study the effect of AZA on autophagy in living cells, HepG2 cells were treated with AZA (100μM) or DMSO (0.2%) during 42h and then stained for 15min with acridine orange (1μM) to

show the organelles with acid pH, as an indirect measure of autophagic's vesicle formation. The number of stained cells was measured by flow cytometry (Figure 1C). AZA treatment significantly enhanced the number of autophagic cells by 53% (stained with acridine orange) compared to cells treated with DMSO (vehicle) (Pvalue<0.001). The autophagic process during treatment of HepG2 cells with AZA was corroborated by the increase of autophagolysosomes observed by electron microscopy (Figure S1A), by the increase of lysosomes visualized by acridine orange staining (Figure S1B) and by the presence of LC-3 punctate formation (Figure S1C). This last biochemical parameter decreases in presence of an MEK<sub>1/2</sub> inhibitor (PD098059) and increases in AZA plus bafilomycin A1 treated cells (Figure S1C). Furthermore, ATG-5 gene was knocked down by siRNA technology leading to a decrease on the autophagic flux with AZA treatment as demonstrated by LC3-I/LC3-II conversion (Figure 1D). All these results suggest that AZA induces autophagy of HepG2 (hepatoblastoma cells) by a p70S6K-dependent mechanism, this behaviour is very different to these observed in non-tumoral liver cells.

**Effect of AZA treatment on cell signaling of HepG2 cells: correlation between LC- 3 and p70S6K**

Since p70S6K can be activated by multiple pathways, we studied the most common pathways through the use of chemical inhibitors. HepG2

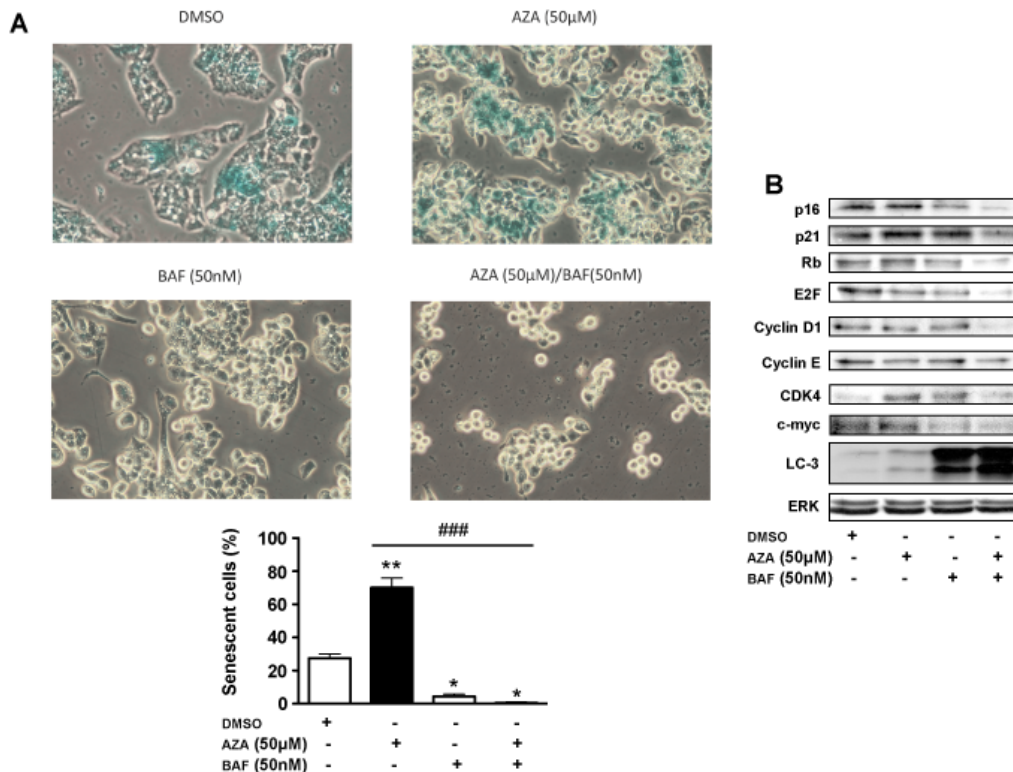


Figure 5. Effect of AZA on cell cycle and senescence. Combination of AZA with bafilomycin A1. (A) HepG2 cells were treated with DMSO, AZA (50μM), bafilomycin A1 (50nM) or with AZA (50μM) plus bafilomycin A1 (50nM) during 24h, after this period SA-β-galactosidase test was performed. (B) Levels of LC-3 and of cell cycle regulatory proteins obtained from cells treated in the above conditions. Significant differences with respect to DMSO (\*) or AZA (#) were analyzed by ANOVA test. Significance levels: p value < 0.05 (\*), p value < 0.01 (\*\*), p value < 0.001 (###). All of the data shown are representative of at least three experiments.

cells were treated for 12h with AZA (50 $\mu$ M) together with different inhibitors: PD098059 (20 $\mu$ M) (MEK inhibitor), SB203580 (20 $\mu$ M) (p38 MAPK inhibitor) or Rapamycin (30nM) (mTOR inhibitor). Only the MEK inhibitor (PD098059) was able to inhibit the effect of AZA simultaneously on LC-3 conversion (Figure 2A) and on p-p70S6K phosphorylation (Figure 2B). Conversely, rapamycin did not show any effect on both parameters activated by AZA (Figure 2C). When we represented the values of p-p70S6K and LC-3 from HepG2 cells in the presence of AZA in combination with different drugs, we observed a good correlation (Pearson's correlation coefficient,  $r=0.89$ ) between both biochemical parameters (Figure 2D). All these results suggest that ERK stimulation by AZA was able to activate p70S6K and by this pathway regulate autophagy. So, we decided to study ERK-mediated signaling. First we analyzed the activation of Ras, the upstream regulator of ERK. For this goal, we treated HepG2 cells with DMSO or AZA (50 $\mu$ M) during 30 min. Cells were also treated with GDP (Ras inhibitor) or GTP $\gamma$ S (Ras activator). Then, Ras pull-down assay was performed (Figure 3A). Ras bound to GTP is active showing high affinity for GST-Raf which can be separated by a glutathione-resin. By using this method, our results showed an increase in Ras activation with AZA treatment (50  $\mu$ M, during 30 min) compared to DMSO (control). This effect was inhibited by the presence of N-acetylcysteine (NAC). In a comparable time-range, we observed an increase in ERK phosphorylation in AZA-treated cells and a decreased response in the presence of PD098059 (20  $\mu$ M) (Figure 3A). As previously described, we also observed that ERK leads to stimulation of c-fos and c-jun expression by acting on transcription factors that are bound to the corresponding promoters (Figure 3B). With the aim to know the efficiency of AZA in ERK activation, as well as the involvement of the corresponding signaling pathways, we performed a dose-response experiment at 12h of incubation (Figure 3C) and a kinetic study with AZA (50  $\mu$ M) (Figure 3D). We observed a very powerful effect of AZA on ERK which is defined by a value of  $EC_{50} = 10$   $\mu$ M (Figure 3C). This result correlates with the effect of AZA on pmTOR ( $EC_{50} = 15$   $\mu$ M), p-p70S6K-Thr 389 ( $EC_{50} = 15$   $\mu$ M) and p-p70S6K-Thr 421/Ser424 ( $EC_{50} = 25$   $\mu$ M). The  $EC_{50}$  values correlated well with the concentration of AZA needed to produce the pharmacological effects. ERK activation by AZA leads to phosphorylation of mTOR, reaching a maximum activation of both enzymes at 12h of incubation to decrease later. The residue Thr389 of p70S6K follows a very similar pattern to the above enzymes, but the residues 421/424 remained phosphorylated between 12 and 42h. The functional significance of these differences is unknown at present. The activation of mTOR/p70S6K is independent of AKT, since this enzyme remained inactive in the presence of AZA in all situations tested (Figure 3C and 3D). Recently, it has been described that ERK is able to phosphorylate and inactivate TSC-2, a tumor suppressor, which blocks the ability of TSC-

2 to inhibit mTOR signaling. Our results support this hypothesis, since the presence of AZA increases the association between ERK and TSC-2, while the formation of this complex was inhibited by the presence of the MEK inhibitor (PD098059) (Figure 3E). Finally, to test the effect of AZA on p70S6K, we studied the activity of the enzyme. Incubation of cells with AZA (50  $\mu$ M) increased p70S6K activity in a time-dependent manner (Figure 3F) which is compatible with the western blot data.

#### **Effect of AZA on proliferation of hepatoma cell lines stimulated by IGF-1**

HepG2 cells were pre-treated with 3-MA (0.5mM) or vehicle and then co-treated with DMSO (0.2%), AZA (50 $\mu$ M) and/or IGF-1 (10nM) for 6 days replacing all these compounds every 24h. Figure 4A shows that AZA treatment significantly inhibits the effect of IGF-1 on proliferation from second day onwards. The effect of AZA on HepG2 cellular proliferation was not reversed by 3-MA. From the fifth day of culture the effects of IGF-1 on proliferation of HepG2 cells were enhanced by 3-MA (Figure 4A). Other hepatoma cell lines in culture such as HuH6, HuH7, Hep3B and Chang Liver cells responded more weakly to the IGF-1, so the effect of AZA was also lower. In HuH6 and Hep3B cells, autophagy inhibition by 3-MA inhibits the effect of IGF-1 (Figure 4B), whereas enhances its effect in the HepG2 cells (Figure 4A). In none of the cell lines studied, the effect of AZA was reversed by 3-MA, and even increased in HuH6 and Hep3B cells (Figure 4B).

#### **Impact of treatment of HepG2 cells with AZA on several cellular parameters**

In order to know whether blocking the signaling cascade of IGF-1 by AZA leads to cell growth inhibition, we evaluated: cell cycle, senescence, necrosis and apoptosis. Cell cycle was evaluated by propidium iodide staining of the cells and subsequent characterization by flow cytometry. As depicted in Figure 4C, treatment of HepG2 cells with AZA significantly inhibited their progression through the cell cycle induced by IGF-1, resulting in increased percentage of cells in the G2/M phase when compared with the control condition (IGF-1 alone). Senescence was studied using the expression of beta-galactosidase and cell cycle regulatory proteins such as p16, p21, Rb, E2F, Cyclin D1, Cyclin E, CDK4 and c-myc. AZA treatment increased senescence in a significant way (Figure 5A), which correlated with an increase in the levels of cell cycle inhibitors such as p16 and p21. It was also observed an increase in CDK4 (Figure 5B). Other proteins related to the cycle did not show a significant change (Figure 5B). These results suggest that autophagy induced by AZA causes senescence.

**Effect of treatment with AZA on IGF-1 signaling in hepatoblastoma cells (HepG2 and HuH6). Mechanism of desensitization.**

The levels of IGF-1R and IRS-1 decreased following treatment with AZA (50µM) in a time-dependent manner in HepG2 cells; the decrease of IRS-1 is preceded by an increase in the phosphorylation on the serine 307 of this protein (Figure 6A). In this context, the overactivation of p70S6K increases the phosphorylation of serine 307 leading to degradation of IRS-1 by the proteasome, resulting in the desensitization to IGF-1. In addition, IRS-1 was degraded in a dose-dependent manner by AZA treatment during 42h (Figure 6A). To demonstrate whether the desensitization to IGF-1 after AZA treatment was due to possible disconnection between the docking protein IRS-1 and p85-PI3K, we performed immunoprecipitation of IRS-1 and subsequent detection of p85. After 42h of treatment with AZA (50 µM), the association between IRS-1 and p85-PI3K was disrupted, leading to the blockade of the signaling cascade activated by IGF-1 (Figure 6B). To evaluate the effect of uncoupling of IRS-1 to p85, we studied the effect of treatment with AZA during 12 and 42h on the phosphorylation of IGF-1R, AKT, p70S6K and FOXO1 in HepG2 cells (Figure 6C). The results were compared with HuH6 cells. AZA treatment provoked a decrease in the

phosphorylation levels of IGF-1R, AKT, FOXO1, and p70S6K in a time dependent-manner in HepG2 cells. These effects were more pronounced at 42 h, since at this time it was observed a dramatic decrease in the phosphorylation of IGF-1R and AKT (ser 473 and thr 308) and the same trend for p70S6K and FOXO1 (Figure 6C) in HepG2 cells. When we treated the HuH6 cells with AZA during 42h under the same conditions we observed a decrease in the amount of IRS-1, which correlates with the decrease in the phosphorylation of AKT and p70S6K activated by IGF-1. However no change was observed in the IGF-1 receptor phosphorylation. This result explains the differences of AZA effect on proliferation of HepG2 and HuH6.

To evaluate the involvement of autophagy in the process of desensitization to IGF-1 induced by AZA, we pretreated HepG2 with two inhibitors of autophagy, 3-methyladenine (3-MA, 0.5 mM) and bafilomycin A1 (BAF, 10 nM) and then with AZA (50 µM) during 42h. As shown in Figure 6D, none of the autophagy inhibitors used sensitized the cells to IGF-1.

**Synergistic action of BAF on the effect of AZA on HepG2 cells.**

When autophagy was blocked with bafilomycin A1, there was a general degradation of proteins that regulate cell cycle (Figure 5B) and cells

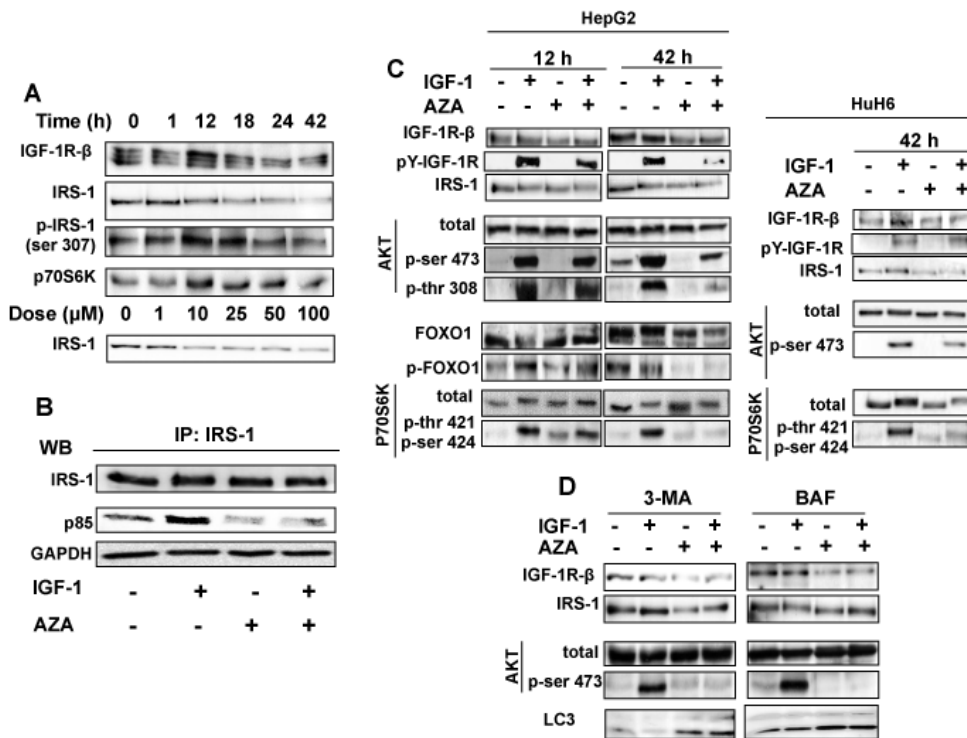


Figure 6. Desensitization by AZA of IGF-1 signaling pathway. (A) Western blot of IGF-1R-β, IRS-1, p-IRS-1 (Ser307) and p70S6K from HepG2 cells treated with AZA (50µM) at different times or in a dose-response during 42h. (B) Immunoprecipitation of IRS-1 and western blot of IRS-1, p85 and GAPDH in HepG2 cells treated with AZA (50µM) during 42h and then with IGF-1 (10nM) for 15min. (C) Western blot of IGF-1R-β, pY-IGF-1R, IRS-1, p-AKT (Ser473), p-AKT (Thr308), AKT, FOXO1, p- FOXO1, p-p70S6K (Thr421/Ser424) and p70S6K from HepG2 and HuH6 cells treated with AZA (50µM) during 12h or 42h and then with IGF-1 (10nM) for 15 min. (D) HepG2 cells pretreated during 1h with 3-MA (0.5mM) or with bafilomycin A1 (10nM) and then with AZA (50µM) during 42h and with IGF-1 (10nM) for the last 15 min. Levels of IGF-1R-β, IRS-1, p-AKT (Ser473), AKT and LC-3 were measured by western blot. Western blots shown are representative of at least three experiments.



entered in apoptosis (Figure 7). As a control we also studied LC-3 (Figure 5B). The combination of AZA and bafilomycin A1 on apoptosis was very strong in HepG2 cells with a very weak effect in Chang Liver cells (Figure 7A). The proapoptotic effect of the combination of AZA plus bafilomycin A1 was verified by characterizing PARP fragmentation (Figure 7C) and by flow cytometry analysis (Figure 7D). In the last approach, propidium iodide was used to stain the nuclei of non-viable cells and annexin V to monitor the cells that enter into the apoptotic program. As shown in Figure 7D, the combination of AZA and bafilomycin A1 increased apoptosis compared to the effect of both drugs separately.

Discussion

This paper describes for the first time the apoptotic effect caused by the combination of AZA and bafilomycin A1 in a hepatoblastoma cell line (HepG2 cells). AZA treatment provoked desensitization of HepG2 cells to IGF-1, resulting in an increase of autophagy, a decrease in its mitogenic capacity and increased senescence (Figure 9). Our results suggest that the mechanism involved in the effect of AZA is specific for HepG2 cells because the drug was able to stimulate the ERK/p70S6K signaling cascade whereas in other cells did not do it. In HuH6 and Hep3B cell lines, AZA was able to inhibit their proliferation; however, it was independent from p70S6K because this enzyme remains inactive after drug treatment. A third behavior towards AZA was observed in HuH7 and Chang liver cell lines which were insensitive to AZA treatment in terms of proliferation, ERK/p70S6K phosphorylation and LC-3 conversion.

The role of p70S6K in autophagy has generated some confusion due to conflicting results. Inhibition of the upstream kinase, mTOR, induces autophagy (23) and accordingly, ribosomal protein S6 phosphorylation has been inversely correlated with autophagy (24). In normal rat hepatocytes, the inhibition of autophagy by insulin is activated by mTOR/p70S6K system (25) which agrees with our data in immortalized mouse

hepatocytes. In these cells there is an inverse relationship between the phosphorylation of p70S6K and LC-3 conversion as well as in tumor cells (HuH6, HuH7, Hep3B and Chang liver), with the exception of HepG2 cells. Moreover the knockdown of p70S6K in mouse hepatocytes causes a dramatic conversion of LC-3, which suggests an increase of autophagy, as it was previously demonstrated in rat hepatocytes (25).

In conclusion, our results strongly suggest that ERK/p70S6K positively regulates the autophagy induced by AZA in HepG2 cells. Similar results has been observed in colon cancer cells treated by 6-thioguanine (26).

These differences may be probably due at least in part to the high dependence of HepG2 cells for IGF-1, in which the hormone behaves as a fully able mitogen to substitute the fetal bovine serum in the culture medium (17). The reason for these differences could be attributed to the high levels of IGF-1R found in HepG2 cells (27).

Recently, it has been elucidated the genetic profile of hepatoblastomas with the goal of identify diagnostic, prognostic markers and as well as therapeutic targets. Eight genes, including IGF-1, were overexpressed in hepatoblastomas with a poor prognosis (9). In addition, deregulation of the ERK signaling pathway and antiapoptotic signaling was preferentially upregulated in aggressive hepatoblastomas (10).

Cancer cells normally have autocrine and paracrine loops that allow cell proliferation without external stimuli (14, 28). IGF-1 constitutes one of these loops. This is particularly important in pediatric tumors, such as the hepatoblastoma, which are dependent on growth hormone and IGF-1 (29). Our results suggest that AZA provokes a sustained activation of the Ras/RAF/ERK/TSC-2 signaling cascade which maintains prolonged activation of mTOR/p70S6K. In rat hepatocyte has been described previously that azathioprine was able to stimulate ERK by a dependent mechanism of oxidative stress (30). Recent results show that reactive oxygen species (ROS) activates ERK signaling pathways inducing autophagy in human hepatocellular carcinoma (31). Several hypotheses arise to explain the

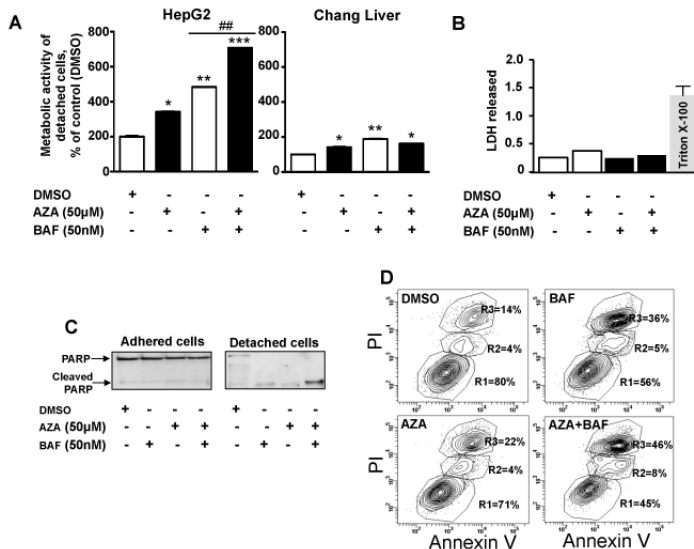


Figure 7. Effect of AZA in cell death of HepG2 cells. Combination of AZA with Bafilomycin A1. HepG2 cells were treated with DMSO, AZA (50µM), Bafilomycin A1 (50nM) or with AZA (50µM) plus Bafilomycin A1 (50nM) during 24h, after were analyzed the metabolic activity of detached cells (A), and the release of lactate dehydrogenase (B). (C) PARP fragmentation was analyzed by western blot from adherent and detached cells treated in the above conditions. (D) Apoptosis of the same cells was studied by flow cytometry as described in Material and Methods. Significant differences with respect to control (DMSO) were analyzed by ANOVA test. (\*\*\*) p value < 0.001, (\*\*) p value < 0.01. All of the data shown are representative of at least three experiments.

autophagy mediated by ERK; for example, activation of this pathway can lead to overexpression and/or relocation of proteins that regulate autophagy, as Atg-7 (31) or beclin 1 (32). It has also been shown that sustained activation of ERK leads to phosphorylation and inactivation of TSC-2 (33). This last possibility correlates well with our results, because as consequence of TSC-2 inactivation the signaling cascade Rheb/mTOR/p70S6K remains constitutively activated resulting in the insensitization of the cell to IGF-1. Recently, has been observed that activation of mTOR/S6K1 signaling by hepatitis C virus resulted in inhibition of IRS-1 functions and insulin resistance (34). In fact when p70S6K remains active during long periods (35, 36), several IRS-1 residues are phosphorylated, serine 307 between others, leading to further degradation of the scaffold protein in the proteasome (37). Moreover, as consequence of AZA treatment, it was observed a lack of coupling of IRS-1 with p85 PI3K upon IGF-1 stimulation. This leads to a process of IGF-1 resistance in HepG2 hepatoblastoma cells treated with AZA, as demonstrated by reduced phosphorylation of Akt, p70S6K and FOXO in response to IGF-1. In the other HuH6 hepatoblastoma cell line used, we also observed that AZA generates resistance to IGF-1, however the effects are minor and independent of p70S6K. IGF-1 is an anabolic hormone that stimulates cell cycle because activates the biosynthesis and inhibits degradation of proteins by autophagy (38, 39), among other pathways. Our results show that AZA treatment drives HepG2 hepatoblastoma cells to a process of autophagy which slows cell cycle and leads to senescence. This last process is characterized by increase of p16 and p21 levels, as it has been previously observed in other models of senescence (40, 41).

At present, it is considered quite likely that the onset of these concatenated cellular processes begin with the activation of autophagy which results in detection of the cell cycle and subsequent senescence (42). However, once the autophagy is triggered, if a blockage occurs in the later stages, cells enter in apoptosis because the cell cannot degrade the organelles present in the

autophagolysosomes, leading to an energetic crisis (43). We think that this mechanism occurs when hepatoblastoma cells are treated with AZA (that stimulates autophagy) and then treated with bafilomycin A1 (which inhibits autophagy). bafilomycin A1 prevents autophagolysosome formation by means of the blockade of the proton pump present in the lysosome (44).

Altogether, our data indicate that AZA induces resistance in hepatoblastoma cells to IGF-1, which leads to activation of autophagy. This process is independent of class III PI3K because autophagy was not inhibited by 3-methyladenine. Autophagy is a process that may serve to tumor cells to mobilize energy resources that enable them to survive in a drug-induced stress situation (45). Hence, if it is inhibited by bafilomycin A1 the cells die by apoptosis. The results presented in this article might be of interest in the treatment of the hepatoblastoma resistant to chemotherapy because it is suspected that part of the resistance is due to overexpression of IGF-1 (9).

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No author has a financial or other conflict of interest.

#### Authors' Contributions

**Participated in research design:** Hernández-Breijo, Román, Fernández-Moreno, and Guijarro

**Conducted experiments:** Hernández-Breijo, Monserrat, and González-Rodríguez

**Contributed new reagents or analytic tools:** Monserrat, Lobo and Valverde

**Performed data analysis:** Hernández-Breijo, Monserrat, Fernández-Moreno and Guijarro

**Wrote or contributed to the writing of the manuscript:** Hernández-Breijo, Román, Valverde, Gisbert and Guijarro

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. Vicente Barrios for advising on the immunoprecipitation of IRS1. Thanks to Dr. Natalio Garcia-Honduvilla for his help with electron microscopy. Thanks to Dr. Patricia Boya for providing LC-3 antibody for immunocytochemistry. Thanks to Dr. Paloma Martín-Sanz for providing HuH6 and Hep3B cell lines. We thank Instalación Radiactiva, Unidad de Cultivos Celulares, Unidad de Microscopía Electrónica from Universidad de Alcalá for the technical help.

#### Grant Support

Spanish Science and Education Ministry [Grant SAF2008-05355] and by Comunidad de Madrid [Grants CCG10-UAH/BIO-5971, S2010/BMD-2423].

#### References

1. Darbari A, Sabin KM, Shapiro CN, Schwarz KB. Epidemiology of primary hepatic malignancies in U.S. children. *Hepatology* 2003; 38:560-6.
2. Ribons LA, Slovis TL. Hepatoblastoma and birth weight. *J Pediatr* 1998; 132:750.
3. Makin E, Davenport M. Fetal and neonatal liver tumours. *Early Hum Dev* 2010; 86:637-42.
4. Malogolowkin MH, Katzenstein HM, Krailo M, Chen Z, Quinn JJ, Reynolds M, et al. Redefining the role of doxorubicin for the treatment of children with hepatoblastoma. *J Clin Oncol* 2008; 26:2379-83.
5. Kim T, Kim DY, Kim KM, Seo JJ, Park KM, Lee YJ, et al. Pediatric liver transplantation for hepatoblastoma: a single center experience. *Transplant Proc* 2012; 44:523-5.
6. Li JP, Chu JP, Yang JY, Chen W, Wang Y, Huang YH. Preoperative transcatheter selective arterial chemoembolization in treatment of unresectable hepatoblastoma in infants and children. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31:1117-23.
7. Ye J, Shu Q, Li M, Jiang TA. Percutaneous radiofrequency ablation for treatment of hepatoblastoma recurrence. *Pediatr Radiol* 2008; 38:1021-3.
8. Sivaprakasam P, Gupta AA, Greenberg ML, Capra M, Nathan PC. Survival and long-term

- outcomes in children with hepatoblastoma treated with continuous infusion of cisplatin and doxorubicin. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33:226-30.
9. Shin E, Lee KB, Park SY, Kim SH, Ryu HS, Park YN, et al. Gene expression profiling of human hepatoblastoma using archived formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 2011; 458:453-65.
  10. Adesina AM, Lopez-Terrada D, Wong KK, Gunaratne P, Nguyen Y, Pulliam J, et al. Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Hum Pathol* 2009; 40:843-53.
  11. Rosenzweig SA, Atreya HS. Defining the pathway to insulin-like growth factor system targeting in cancer. *Biochem Pharmacol* 2010; 80:1115-24.
  12. Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, Tong M, D'Errico A, Trevisani F, et al. Aspartyl-asparagyl beta hydroxylase over-expression in human hepatoma is linked to activation of insulin-like growth factor and notch signaling mechanisms. *Hepatology* 2006; 44:446-57.
  13. Price JA, Kovach SJ, Johnson T, Koniaris LG, Cahill PA, Sitzmann JV, et al. Insulin-like growth factor I is a comitogen for hepatocyte growth factor in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002; 36:1089-97.
  14. Hewish M, Chau I, Cunningham D. Insulin-like growth factor 1 receptor targeted therapeutics: novel compounds and novel treatment strategies for cancer medicine. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2009; 4:54-72.
  15. Tanaka S, Arai S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci* 2009; 100:1-8.
  16. Hernández-Breijo B, Monserrat J, Ramírez-Rubio S, Cuevas EP, Vara D, Díaz-Laviada I, et al. Preclinical evaluation of AZA plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17:3899-911.
  17. Cuevas EP, Escribano O, Chiloeches A, Ramirez Rubio S, Roman ID, Fernandez-Moreno MD, et al. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol* 2007; 46:1089-98.
  18. Cuevas EP, Escribano O, Monserrat J, Martinez-Botas J, Sanchez MG, Chiloeches A, et al. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate-4 enhances actinomycin D-and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death in hepatocarcinoma cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2009; 108:1292-301.
  19. Escribano O, Fernandez-Moreno MD, Zuero JA, Menor C, Fueyo J, Roper RM, et al. Insulin receptor substrate-4 signaling in quiescent rat hepatocytes and in regenerating rat liver. *Hepatology* 2003; 37:1461-9.
  20. González-Rodríguez A, Alba J, Zimmerman V, Kozma SC, Valverde AM. S6K1 deficiency protects against apoptosis in hepatocytes. *Hepatology* 2009; 50:216-29.
  21. Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; 38:325-9.
  22. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:9363-7.
  23. Lum JJ, DeBerardinis RJ, Thompson CB. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:439-48.
  24. Blommaert EF, Luiken JJ, Blommaert PJ, van Woerkom GM, Meijer AJ. Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1995; 270:2320-6.
  25. Kanazawa T, Taneike I, Akaishi R, Yoshizawa F, Furuya N, Fujimura S, et al. Amino acids and insulin control autophagic proteolysis through different signaling pathways in relation to mTOR in isolated rat hepatocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:8452-9.
  26. Zeng X, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res* 2008; 68:2384-90.
  27. Niu J, Li XN, Qian H, Han Z. siRNA mediated the type 1 insulin-like growth factor receptor and epidermal growth factor receptor silencing induces chemosensitization of liver cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134:503-13.
  28. Kashima H, Shiozawa T, Miyamoto T, Suzuki A, Uchikawa J, Kurai M, et al. Autocrine stimulation of IGF1 in estrogen induced growth of endometrial carcinoma cells: involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway followed by upregulation of cyclin D1 and cyclin E. *Endocrine-Related Cancer* 2009; 16:113-22.
  29. Kim SY, Toretsky JA, Scher D, Helman LJ. The role of IGF-1R in pediatric malignancies. *Oncologist* 2009; 14:83-91.
  30. Menor C, Fernández-Moreno MD, Fueyo JA, Escribano O, Olleros T, Arriaza E, et al. Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311:668-76.
  31. Gong K, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (Atg7) and reactive oxygen species (ROS)/ extracellular-signal-regulated kinase (ERK) regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2012; 287:35576-88.
  32. Wang J, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, et al. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 2009; 284:21412-24.

33. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; 121:179-93.
34. Bose SK, Shrivastava S, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J Virol* 2012; 86:6315-22.
35. Arvisais E, Hou X, Wyatt TA, Shirasuna K, Bollwein H, Miyamoto A, et al. Prostaglandin F2alpha represses IGF-I-stimulated IRS1/phosphatidylinositol-3-kinase/AKT signaling in the corpus luteum: role of ERK and P70 ribosomal S6 kinase. *Mol Endocrinol* 2010; 24:632-43.
36. Zhang J, Gao Z, Yin J, Quon MJ, Ye J. S6K directly phosphorylates IRS-1 on Ser-270 to promote insulin resistance in response to TNF-(alpha) signaling through IKK2. *J Biol Chem* 2008; 283:35375-82.
37. Schmitz-Peiffer C, Whitehead JP. IRS-1 regulation in health and disease. *IUBMB Life* 2003; 55:367-74.
38. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335:1-32.
39. Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol Cell Biol* 2006; 84:448-54.
40. Park SH, Lim JS, and Jang KL (2011) All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* 310: 232-239.
41. Kim TR, Lee HM, Lee SY, Kim EJ, Kim KC, Paik SG, Cho EW, and Kim IG (2010) SM22 $\alpha$ -induced activation of p16INK4a/retinoblastoma pathway promotes cellular senescence caused by a subclinical dose of  $\gamma$ -radiation and doxorubicin in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 400: 100-105.
42. Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, et al. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23:798-803.
43. Kanematsu S, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, et al. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30:3381-90.
44. Kawaguchi T, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che XF, Naito M, et al. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* 2011; 38:643-54.
45. Guijarro LG, Román ID, Fernández-Moreno D, Gisbert JP, and Hernández-Breijo B. Is the autophagy induced by thiopurines beneficial or deleterious?. *Curr Drug Metab* 2012; 13:1267-76.

Supplementary data

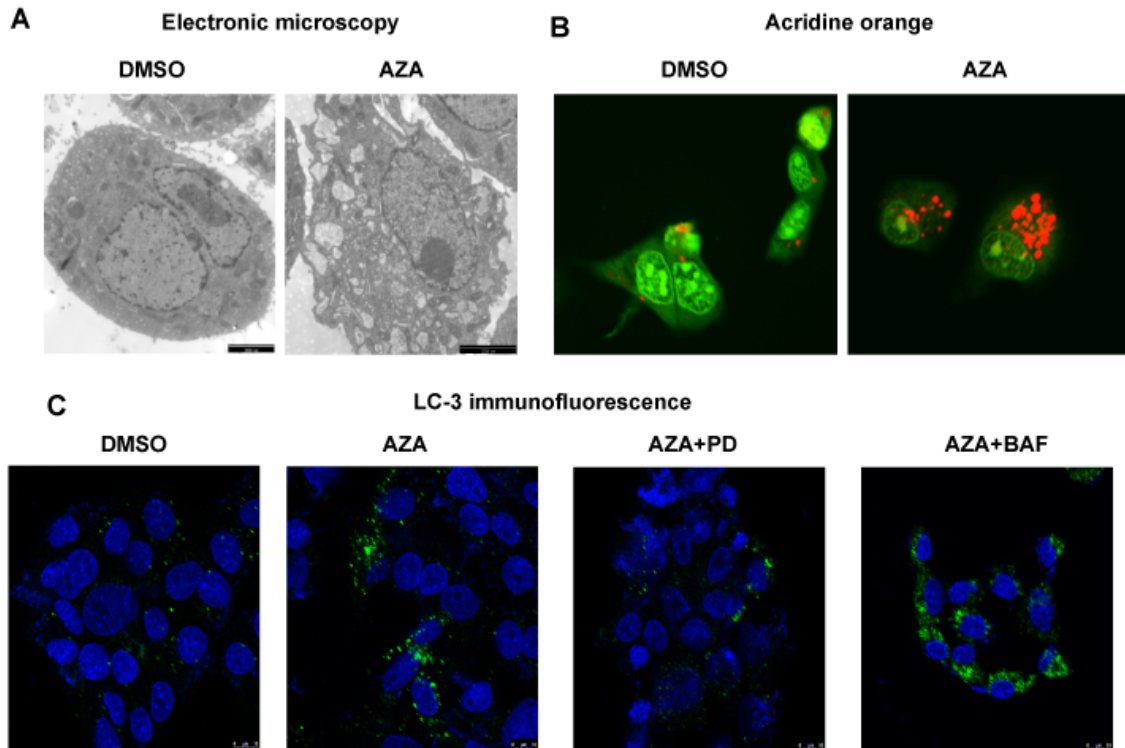


Figure S1. Characterization of autophagy induced by AZA in HepG2 cells. After AZA (50 $\mu$ M) treatment, autophagy was characterized by (A) electron microscopy and (B) acridine orange staining visualized by confocal microscopy. (C) LC-3 levels were analyzed using confocal microscopy in HepG2 cells treated with AZA (50 $\mu$ M), AZA plus PD098059 (20 $\mu$ M), or AZA plus BAF (50nM) during 42h. Images shown are representative of three different experiments and from several separated fields.

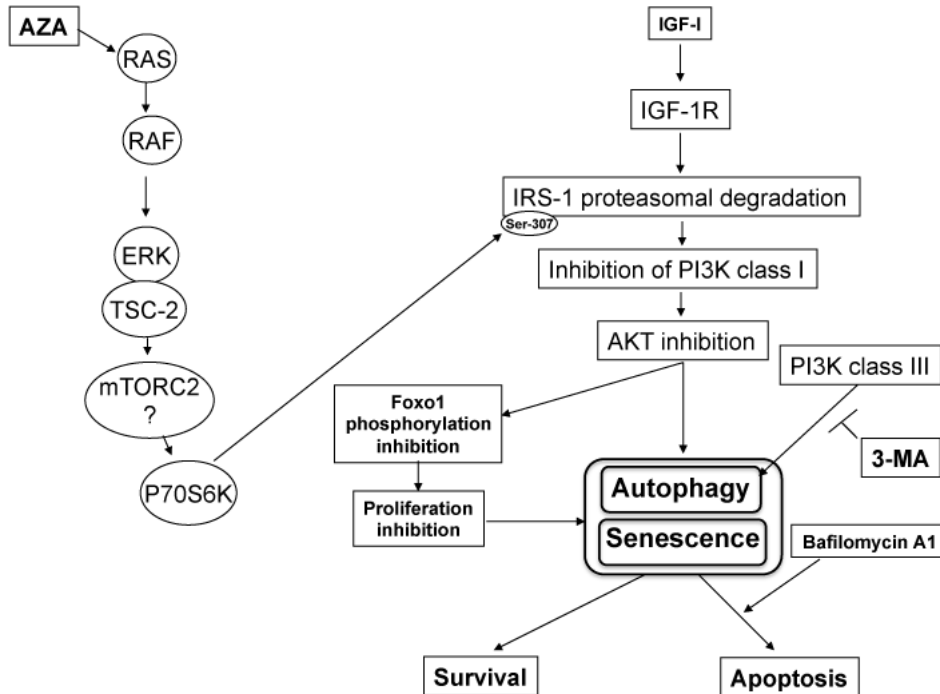


Figure S2. Model established by our results.





# *CAPÍTULO III*

---

---

*“Las ideas no duran mucho. Hay que hacer  
algo con ellas”.*

**Santiago Ramón y Cajal**





## CAPÍTULO III

# EVALUACIÓN PRECLÍNICA DE LA COMBINACIÓN DE AZATIOPRINA Y BUTIONINA SULFOXIMINA PARA EL TRATAMIENTO DEL HEPATOCARCINOMA Y DEL CARCINOMA DE COLON

### **Justificación del trabajo:**

Una de las causas por la que se cree que los tumores son tan resistentes a los tratamientos con fármacos es porque las células que los componen poseen altos niveles de enzimas y moléculas antioxidantes, que impiden el aumento de especies reactivas de oxígeno y radicales libres y por lo tanto los protegen del daño oxidativo generado por la quimioterapia.

Diferentes estudios indican que uno de los agentes antioxidantes más abundantes en el interior celular, es el glutatión (GSH). Cuando los niveles de GSH en la célula disminuyen se produce un aumento de la oxidación de los diferentes componentes celulares, lo que puede activar señales de apoptosis [Awasthi YC et al, 2009]. La disminución de los niveles de GSH, debida a la inhibición de la enzima gamma-glutamilcisteinil sintetasa (GCS) encargada de su síntesis, podría disminuir la supervivencia celular y por lo tanto producir la muerte de las células cancerosas. La L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) inhibe competitivamente la enzima GCS y por lo tanto disminuye la síntesis de GSH; como consecuencia de esta propiedad se está evaluando para el tratamiento de diversos tipos de cáncer [Vahrmeijer AL et al, 1999]. Por otro lado, la AZA también disminuye los niveles de GSH intracelulares porque en su primer paso de metabolización consume glutatión en una reacción catalizada por la enzima glutatión S-transferasa (GST), como se ha descrito en la introducción de la tesis.

### **Hipótesis y objetivo concreto:**

La combinación de estas dos moléculas, BSO y AZA, podría generar una sinergia terapéutica en el tratamiento del cáncer.

**Metodología experimental:**

Para demostrar o desmentir esta hipótesis hemos estudiado los siguientes aspectos, tras el tratamiento con los fármacos:

- 1). Evaluación de diferentes parámetros relacionados con la actividad celular.
  - a. Estudio de la actividad metabólica y de la viabilidad de las células HepG2 tras el tratamiento con AZA, en ausencia/presencia de BSO, a diferentes dosis y a distintos tiempos.
  - b. Medida de los niveles de GSH de las células HepG2, tras el tratamiento con AZA, con BSO y con la combinación de BSO y AZA
  - c. Valoración de la actividad metabólica de las células procedentes de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang) y de cáncer de colon (LoVo, SW-480, RKO, SW-48) tras el tratamiento con AZA, con BSO y con BSO y AZA.
  - d. Estudio del efecto de diferentes tiopurinas (6-MP, 6-MMP, 6-TG, 6-MTG) en combinación con BSO sobre la actividad metabólica de los siguientes tipos celulares: HepG2, LoVo, SW-480, RKO y SW-48. Los resultados se compararon con el efecto de la combinación de AZA y BSO.
- 2). Caracterización del tipo de muerte celular inducido por la AZA y por la combinación de BSO y AZA.
  - a. Ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) tras el tratamiento con AZA y con BSO y AZA a diferentes tiempos. Se utilizó como control positivo un extracto de células tratadas con Triton X-100.
  - b. Análisis por citometría de flujo de las células HepG2 usando yoduro de propidio, anexina V y JC-1.
  - c. Ensayo de la fragmentación internucleosomal de la cromatina analizando el ADN en geles de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio.
  - d. Análisis de los niveles de citocromo c y de la oxidación de proteínas en los diferentes compartimentos celulares.
  - e. Análisis de la participación de la mitocondria en la muerte celular inducida por fármacos mediante la valoración de los niveles de Bax, Bid, Bad, Bcl-2 y citocromo c. Evaluación de la actividad de la caspasa-3 y de la fragmentación de su sustrato endógeno PARP.

3). Estudio del mecanismo de señalización implicado en la muerte celular.

Con el objeto de estudiar el mecanismo de señalización implicado en la muerte celular inducida por BSO y AZA se realizaron los siguientes experimentos:

- a. Estudio de la activación de las quinasas JNK y p38, de los niveles de proteínas oxidadas en la célula y de su reversión con N-acetilcisteína (NAC).
- 4). Evaluación de la eficacia y de la toxicidad de la AZA, del BSO y de la combinación de ambos fármacos, en un tumor subcutáneo generado por inyección de células HepG2 en un ratón atímico.

Para ello se inyectaron  $10^7$  células HepG2 en el costado derecho del ratón y se permitió la formación del tumor. Se aleatorizaron los animales en cuatro grupos y se aplicaron a cada grupo los siguientes tratamientos: DMSO, BSO, AZA, BSO + AZA. Después del sacrificio se extrajo la sangre del animal, de donde se obtuvo el plasma, y se guardaron los tumores. Se evaluó el volumen del tumor y se estudiaron los siguientes parámetros bioquímicos:

- a. Medida de la actividad de las enzimas alanina aminotransaminasa (ALT), aspartato aminotransaminasa (AST) y creatina quinasa (CK) en el plasma de los animales con el objetivo de evaluar la toxicidad de los diferentes fármacos.
- b. Valoración de los niveles de GSH en los tumores y de la fragmentación de la procaspasa-3.

### **Resultados y discusión:**

Nuestros resultados indican que la combinación de BSO y AZA podría ser eficaz para el tratamiento de tumores quimioresistentes a diferentes fármacos. Los resultados preclínicos obtenidos en este trabajo sugieren que una combinación de fármacos clásicos podría ser útil en el tratamiento local del hepatocarcinoma y de la metástasis de cáncer de colon en el hígado.

Cuando el hepatocarcinoma no se puede eliminar quirúrgicamente, es tratado por quimioembolización transarterial (TACE) [Forner A et al, 2009], [Okusaka T et al, 2009], mediante la cual se induce la necrosis del tumor con participación de diferentes fármacos como por ejemplo doxorrubicina, epirrubicina, mitomicina c, cisplatino, 5-fluoracilo y más recientemente con zinostatina [Okusaka T et al, 2009].

La combinación de BSO y AZA ofrece la ventaja de actuar por un mecanismo de acción diferente al previamente utilizado en la terapia por TACE. Además los resultados revelan que la co-terapia de BSO y AZA podría tener un perfil farmacodinámico diferente al de otras moléculas de la familia de las tiopurinas como por ejemplo la 6-MP y la 6-TG. La aplicación local de BSO y AZA sobre el tumor subcutáneo, produjo una disminución de su volumen, que no se observó en la terapia con los dos fármacos por separado. Por otro lado, las dosis aplicadas a los ratones desnudos son comparables a las usadas en el trasplante hepático [Zekry A et al, 2004] y en los ensayos clínicos que se están realizando con el BSO [Bailey HH et al, 1997]. El efecto terapéutico se produjo con pequeños cambios en los niveles de aminotransferasas (ALAT y ASAT) y de creatin quinasa (CK) lo que indica que los efectos de la combinación de ambos fármacos sobre el hígado y sobre el músculo fueron bajos. Los resultados obtenidos *in vitro* sobre células HepG2, sugieren que la combinación de BSO y AZA induce necroptosis por activación de JNK y p38. Dicho tipo de muerte celular aunque está regulada por diferentes tipos de quinasas, es independiente de la activación de caspasas y reproduce las características morfológicas de la necrosis como por ejemplo la ruptura de la membrana con liberación de la enzima lactato deshidrogenasa. Los resultados obtenidos sugieren que el co-tratamiento con BSO y AZA podría inducir la muerte de las células HepG2 por depleción del GSH presente en diferentes compartimentos celulares, lo cual podría explicar el efecto sinérgico de ambos compuestos sobre la citotoxicidad de las células tumorales. Este argumento está basado en que:

- a). La AZA produce una depleción de GSH más rápida y acusada si las células han sido pre-tratadas con BSO, con respecto a las células que no lo han sido.
- b). La AZA podría activar la enzima p38 por un mecanismo dependiente de GSH, mientras que la depleción de GSH por BSO no activa p38.
- c). La AZA podría estimular la activación de JNK en células sensibilizadas por BSO, dicha activación es revertida por NAC, lo que sugiere el papel del GSH.

En conclusión la diferencia en el comportamiento de las quinasas del estrés (JNK y p38) frente a dos moléculas que disminuyen los niveles de GSH, como son AZA y BSO sugiere que actúan en dos compartimentos subcelulares diferentes.

En este sentido, la combinación de AZA y BSO da lugar a la oxidación de proteínas en diferentes compartimentos subcelulares, como por ejemplo en el citosol,

núcleo y mitocondria, por un mecanismo dependiente de GSH, como lo demuestra su reversión por NAC.

Los estudios cinéticos realizados sugieren que la disminución de GSH generada por la combinación de BSO y AZA estimuló la activación de JNK, el aumento de los niveles de Bax y la subsecuente desregulación mitocondrial en las células HepG2. Se sugiere la existencia de una crisis mitocondrial por la liberación de citocromo c desde la mitocondria al citosol, así como por la oxidación de proteínas mitocondriales. Se ha demostrado previamente que la liberación del citocromo c de la mitocondria da lugar a la activación de la caspasa-3 [Pradelli LA et al, 2010], sin embargo no observamos un aumento de la actividad de la caspasa-3, lo que se podría explicar por una situación de anergia concomitante a la liberación del citocromo c, con lo que el programa de apoptosis dependiente de la mitocondria no se podría ejecutar. Sin embargo, en esta situación la liberación de calcio mitocondrial podría activar a otras proteasas como las catepsinas [Chaitanya GV et al, 2009], [Gobeil S et al, 2001], que explicarían la degradación de procaspasa-3, PARP y GCS, dando lugar a una mayor depleción de GSH, pérdida de integridad de la membrana citoplasmática, liberación de LDH citosólico y degradación del ADN.

Algunos de estos cambios bioquímicos en la célula son característicos de la apoptosis y otros son de la necrosis por ello pensamos que al comienzo del tratamiento con AZA y BSO, se producen alteraciones que son características de la apoptosis como por ejemplo la activación de JNK y p38, el aumento de Bax, la liberación de citocromo c y la traslocación de fosfatidilserina a la capa externa de la membrana celular. Sin embargo, con posterioridad se produce una crisis mitocondrial que desencadena una situación de anergia, tal y como se ha observado tras el tratamiento de hepatocitos de rata con AZA [Lee AU et al, 2001], [Menor C et al, 2004], que imposibilita la activación de la caspasa-3 y las subsiguientes etapas características de la apoptosis.

Los resultados obtenidos ponen de relevancia el papel del GSH en el paso de la apoptosis a la necrosis inducida por BSO y AZA, porque la adición de NAC en combinación con el co-tratamiento de BSO y AZA revierte la mayoría de los efectos necróticos que hemos mencionado anteriormente pero no inhibe la apoptosis observada gracias al marcaje de las células con la sonda anexina V, lo que es característico de la apoptosis temprana. Por lo tanto, tras el tratamiento con AZA y BSO, si los niveles de

GSH son adecuados, la célula entra en apoptosis, mientras que si disminuyen los niveles de GSH, la célula entra en necrosis.

Recientemente también se ha demostrado la importancia de GSH en la inducción de la muerte celular a través de la cascada GST-JNK. Normalmente la actividad de JNK está inhibida debido a que se encuentra unida a GST pero una disminución de los niveles de GSH produce la oxidación de la GST- $\pi$  en las cisteínas Cys47 y Cys101, provocando la liberación de JNK, su activación y su implicación en la muerte celular programada [Townsend DM et al, 2009]. Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren un mecanismo similar de activación de JNK por el co-tratamiento con BSO y AZA. En este sentido, otros agente quimioterapéutico como el etopósido puede activar JNK en las células HepG2 para provocar apoptosis [Kim BJ et al, 2006]. Sin embargo, en algunas ocasiones podría ser conveniente generar muerte celular por necrosis para tratar aquellos tumores resistentes a la apoptosis. Por ejemplo en el tratamiento del hepatocarcinoma, la inducción por necrosis se cree que es más efectiva en las terapias locales como el TACE [Forner A et al, 2009] porque genera una inflamación secundaria que prolonga el efecto terapéutico.

Los resultados generados en este tercer trabajo permiten explicar el mecanismo de muerte celular inducida por el tratamiento combinado de BSO y AZA en las células HepG2 y en otros tipos de células cancerosas hepáticas (HuH7 y Chang), así como en las de colon (LoVo, SW-480, RKO y SW-48). Para que la combinación de BSO y AZA sea considerada como un medicamento aplicable en el tratamiento del cáncer, la dosis eficaz administrada de cada uno debe ser compatible con la utilizada habitualmente en la práctica clínica. Nuestros resultados demuestran que la aplicación de BSO y AZA a dosis farmacológicas en la zona peritumoral reduce el volumen del tumor sin efectos secundarios considerables. La efectividad del BSO en el tratamiento de tumores sólidos se ha observado previamente en combinación con trióxido de arsénico [Maeda H et al, 2004], con borocaptato de sodio [Yoshida F et al, 2008] y con melphalan [Vahrmeijer AL et al, 1999].

### **Conclusiones:**

Nuestros resultados aportan la evidencia experimental para el uso clínico de la combinación de BSO y AZA en el tratamiento de tumores sólidos.

El análisis de los datos obtenidos nos permitió llegar a la conclusión de que la terapia combinada de BSO y AZA podría ser interesante para el tratamiento de los tumores refractarios de colon y de hígado. Los resultados dieron lugar a la publicación del artículo **“Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma”** en la revista *“World Journal of Gastroenterology”* 2011, 17: 3899-3911 y a la publicación de la patente titulada **“Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario”** en la Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) con referencia ES 2396108 A1, con referencia internacional WO 2013/017724 A1 y solicitud de PCT (PCT/ES2012/070593).







## Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma

Borja Hernández-Breijo, Jorge Monserrat, Sara Ramírez-Rubio, Eva P Cuevas, Diana Vara, Inés Díaz-Laviada, M Dolores Fernández-Moreno, Irene D Román, Javier P Gisbert, Luis G Guijarro

Borja Hernández-Breijo, Sara Ramírez-Rubio, Eva P Cuevas, M Dolores Fernández-Moreno, Irene D Román, Luis G Guijarro, Molecular Hepatic Toxicology Unit, Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Alcalá, Networked Biomedical Research Center of Hepatic and Digestive Diseases (CIBEREHD), Alcalá de Henares 28871, Spain

Jorge Monserrat, Medicine Department, University of Alcalá, Alcalá de Henares 28871, Spain

Diana Vara, Inés Díaz-Laviada, Neuroendocrinology of Cannabinoid/Vanilloid System Unit, Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Alcalá, Alcalá de Henares 28871, Spain

Javier P Gisbert, Gastroenterology Unit, Hospital de la Princesa, Institute of Health Research Princesa, Networked Biomedical Research Center of Hepatic and Digestive Diseases (CIBEREHD), Madrid 28006, Spain

**Author contributions:** Hernández-Breijo B performed the majority of the *in vitro* and *in vivo* experiments; Monserrat J performed cytometry; Ramírez-Rubio S and Cuevas EP performed *in vitro* experiments; Vara D performed the *in vivo* experiments; Fernández-Moreno MD, Román ID performed analysis of glutathione levels and reviewed the manuscript; Díaz-Laviada I and Gisbert JP reviewed the manuscript; Guijarro LG designed the study and wrote the manuscript.

Supported by Grants from SAF2008-05355 and CCG07-UAH/BIO-2085

Correspondence to: Dr. Luis González Guijarro, Professor, Biochemistry and Molecular Biology Department, University of Alcalá, Alcalá de Henares 28871,

Spain. [luis\\_guijarro@telefonica.net](mailto:luis_guijarro@telefonica.net)

Telephone: +34-91-885-4865 Fax: +34-91-885-4585

Received: January 10, 2011 Revised: March 26, 2011

Accepted: April 2, 2011

Published online: September 14, 2011

localized application into HepG2 tumor *in vivo*.

**METHODS:** Different hepatoma and colon carcinoma cell lines (HepG2, HuH7, Chang liver, LoVo, RKO, SW-48, SW-480) were grown in minimal essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic solution and maintained in a humidified 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub>. These cells were pretreated with BSO for 24 h and then with AZA for different times. We examined the effects of this combination on some proteins and on cellular death. We also studied the efficacy and the safety of AZA (6 mg/kg per day) and BSO (90 mg/kg per day) in HepG2 tumor growth *in vivo* using athymic mice. We measured safety by serological markers such as amino-transferases and creatine kinase.

**RESULTS:** The *in vitro* studies revealed a new mechanism of action for the AZA plus BSO combination in the cancer cells compared with other thiopurines (6-mercaptopurine, 6-methylmercaptopurine, 6-thioguanine and 6-methylthioguanine) in combination with BSO. The cytotoxic effect of AZA plus BSO in HepG2 cells resulted from necroptosis induction in a mitochondrial-dependent manner. From kinetic studies we suggest that glutathione (GSH) depletion stimulates c-Jun amino-terminal kinase and Bax translocation in HepG2 cells with subsequent deregulation of mitochondria (cytochrome c release, loss of membrane potential), and proteolysis activation leading to loss of membrane integrity, release of lactate dehydrogenase and DNA degradation. Some of this biochemical and cellular changes could be reversed by N-acetylcysteine (a GSH replenisher). *In vivo* studies showed that HepG2 tumor growth was inhibited when AZA was combined with BSO.

**CONCLUSION:** Our studies suggest that a combination of AZA plus BSO could be useful for localized

### Abstract

**AIM:** To evaluate the efficacy and the safety of azathioprine (AZA) and buthionine sulfoximine (BSO) by

treatment of hepatocellular carcinoma as in the currently used transarterial chemoembolization method.

© 2011 Baishideng. All rights reserved.

**Key words:** Azathioprine; Buthionine sulfoximine; Transarterial chemoembolization; Glutathione; Apoptosis; Necrosis

**Peer reviewer:** Dario Conte, Professor, GI Unit-IRCCS Osp. Maggiore, Chair of Gastroenterology, Via F Sforza, 35, Milano 20122, Italy

Hernández-Breijo B, Monserrat J, Ramírez-Rubio S, Cuevas EP, Vara D, Díaz-Laviada I, Fernández-Moreno MD, Román ID, Gisbert JP, Guijarro LG. Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. *World J Gastroenterol* 2011; 17(34): 3899-3911 Available from: URL: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v17/i34/3899.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v17.i34.3899>

## INTRODUCTION

The incidence of hepatocellular carcinoma (HCC) is increasing, and currently there are approximately 1 million new cases annually worldwide<sup>[1]</sup>. Classical curative options available are surgical resection or liver transplantation<sup>[2]</sup>. For unresectable HCC, an effective treatment is transarterial chemoembolization (TACE)<sup>[3]</sup>. In TACE, the branch of the hepatic artery supplying the tumor is occluded at the time of arteriography by injection of lipidol and/or gelatin-sponge particles, which results in necrosis of the tumor. To increase that effect, chemotherapeutic agents (e.g., doxorubicin, epirubicin, mitomycin c, cisplatin or 5-fluorouracil) are often mixed with lipidol<sup>[3]</sup>. A significant number of patients benefit from treatment with TACE<sup>[3]</sup>. For further progress in this encouraging treatment, other antitumor drugs are needed. One of the problems in treating HCC is chemoresistance, therefore the majority of systemic therapies have been disappointing. For years researchers have observed that an elevation in intracellular glutathione (GSH) has been associated with resistance to irradiation and to chemotherapy, and correspondingly, the diminution of GSH levels is associated with sensitization to both types of therapy<sup>[4]</sup>. Azathioprine (AZA) and buthionine sulfoximine (BSO) are medicines which decrease GSH levels by different mechanisms. Azathioprine belongs to the family of thiopurines with cytostatic activity, which is used in the treatment of autoimmune diseases, organ transplantation and in acute lymphoblastic leukemia<sup>[5]</sup>. The first step in AZA activation consumes GSH, leading to release of 6-mercaptopurine from the imidazole moiety in an enzymatic reaction catalyzed by several glutathione-S-transferase (GST) isoforms<sup>[5]</sup>. BSO is a competitive inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (GCS), the rate-limiting step in the biosynthetic pathway

of GSH production<sup>[6]</sup>. With the aim of treating tumors that overexpress glutathione (e.g., hepatocarcinoma), several groups undertook phase I clinical studies with BSO to evaluate whether modulation of GSH could be clinically useful<sup>[7]</sup>. In these preliminary studies, the drug proved to be well tolerated and safe, which prompted us to study the effect of BSO combined with AZA: (1) on cell death of HCC cell lines (Hep G2, Huh7 and Chang cells) in culture; and (2) on the volume of the tumor obtained by injection of HepG2 into athymic mice *in vivo*. These results were compared with colon cancer cell lines (Lovo, SW-480, RKO and SW-48).

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

AZA was a gift from UCB Pharma SA (Madrid, Spain). Antibodies against phospho-p54/46 JNK (c-jun N-terminal kinase), p-p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase), JNK, p38 MAPK and  $\alpha$ -tubulin were from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, Massachusetts) and antibodies against Bax, Bid, Bad, Bcl-2, cytochrome c, procaspase-3, GCS, nucleoporin and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) were from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). p-38 MAPK inhibitor [SB203580, 4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-1H-imidazole], JNK inhibitor (SP600125, 1,9-pyrazoloanthrone) were from Calbiochem (Barcelona, Spain). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT), DL-buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), 6-mercaptopurine and 6-methylmercaptopurine were from Sigma Chemical Co. (Madrid, Spain). 2-amino-6-mercaptopurine and 2-amino-6-methylmercaptopurine were from ICN Biomedicals Inc. (Ohio, United States). Z-VAD-mfk caspase-3 inhibitor was from Bachem (Heidelberg, Germany). Ac-DEVD-AMC was from Alexis Biochemicals (San Diego, California). OxyBlot™ Protein Oxidation Kit was from Millipore (Billerica, Massachusetts). All other reagents were of the highest grade of purity available.

### Cell culture

HepG2, HuH7 and Chang cells, LoVo, SW-480, RKO and SW-48 cells were from ATCC and were grown in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic/antimycotic solution and maintained in a humidified 37 °C incubator with 5% CO<sub>2</sub>.

### Metabolic activity and cell viability

The MTT reduction assay was performed as described previously<sup>[8]</sup>. Cell viability was determined by the trypan blue exclusion assay as previously described<sup>[9]</sup>.

### Analysis of GSH

Intracellular GSH levels were determined fluorometrically as described previously<sup>[10]</sup>.

### Lactate dehydrogenase release assay

Cellular supernatants were mixed with lactate dehydro-

genase (LDH) substrate (0.2 mol/L Tris-HCl buffer, pH 8.2, containing 2.5 mg/mL L-lactate, 2.5 mg/mL NAD<sup>+</sup>, 0.1% (v/v) Triton X-100, 1-methoxyphenazine methosulfate and MTT). The formazan formed was measured at a wavelength of 570 nm and reference of 655 nm<sup>[8]</sup>.

### DNA fragmentation gel assay

The study of DNA fragmentation was performed as previously described<sup>[11]</sup>.

### Western blotting

Total cell protein was extracted as described previously<sup>[11]</sup>. The proteins were determined by the Bradford method and were loaded onto sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gel and transferred to nitrocellulose membranes overnight at 25 V and 4 °C. The immunoblots were developed as previously described<sup>[11]</sup>.

### Cytometry

Mitochondrial impairment was estimated using a JC-1 probe (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide/chloride) as previously described<sup>[12]</sup>. Cell cycle analysis using propidium iodide staining was performed as described previously<sup>[12]</sup>.

### Caspase-3 activity analysis

Cells were lysed in 10 mmol/L Tris-HCl buffer (pH 7.5) containing NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaHPO<sub>4</sub> (10 mmol/L), Triton-X-100 (1%), NaCl (130 mmol/L) and sodium pyrophosphate (10 mmol/L). The cell lysates were incubated for 60 min at 37 °C in a 20 mmol/L HEPES buffer (pH 7.5) containing, glycerol (10%), DTT (2 mmol/L) and the specific fluorogenic substrate Ac-DEVD-AMC. Cleavage of the fluorescent caspase-3 substrate was monitored using a fluorescence plate reader at excitation/emission wavelengths of 355/460 nm.

### Analysis of in vivo tumor growth inhibition

Nude mice were subcutaneously inoculated with 10<sup>7</sup> HepG2 cells. After solid tumor formation (i.e., tumor volume 100 mm<sup>3</sup>), the tumor-bearing nude mice were randomized into four experimental groups, each one with eight mice. These groups were treated by peritumoral injection with 0.1 mL dimethyl sulfide (DMSO) (5%), BSO (90 mg/kg per day), AZA (6 mg/kg per day) or BSO (90 mg/kg per day) plus AZA (6 mg/kg per day), respectively. The BSO treatment was daily, while the AZA treatment was given on alternate days for a total of 12 d. Tumor size was measured every day. At the end of the experiment, all the animals were sacrificed. Plasma levels of creatine kinase, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were also determined, following the procedures stated by the provider (Spinreact).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism package (GraphPad Software Inc., San Diego,

CA). Values are reported as mean ± SE and evaluated by the analysis of variance. The statistical significance was set at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

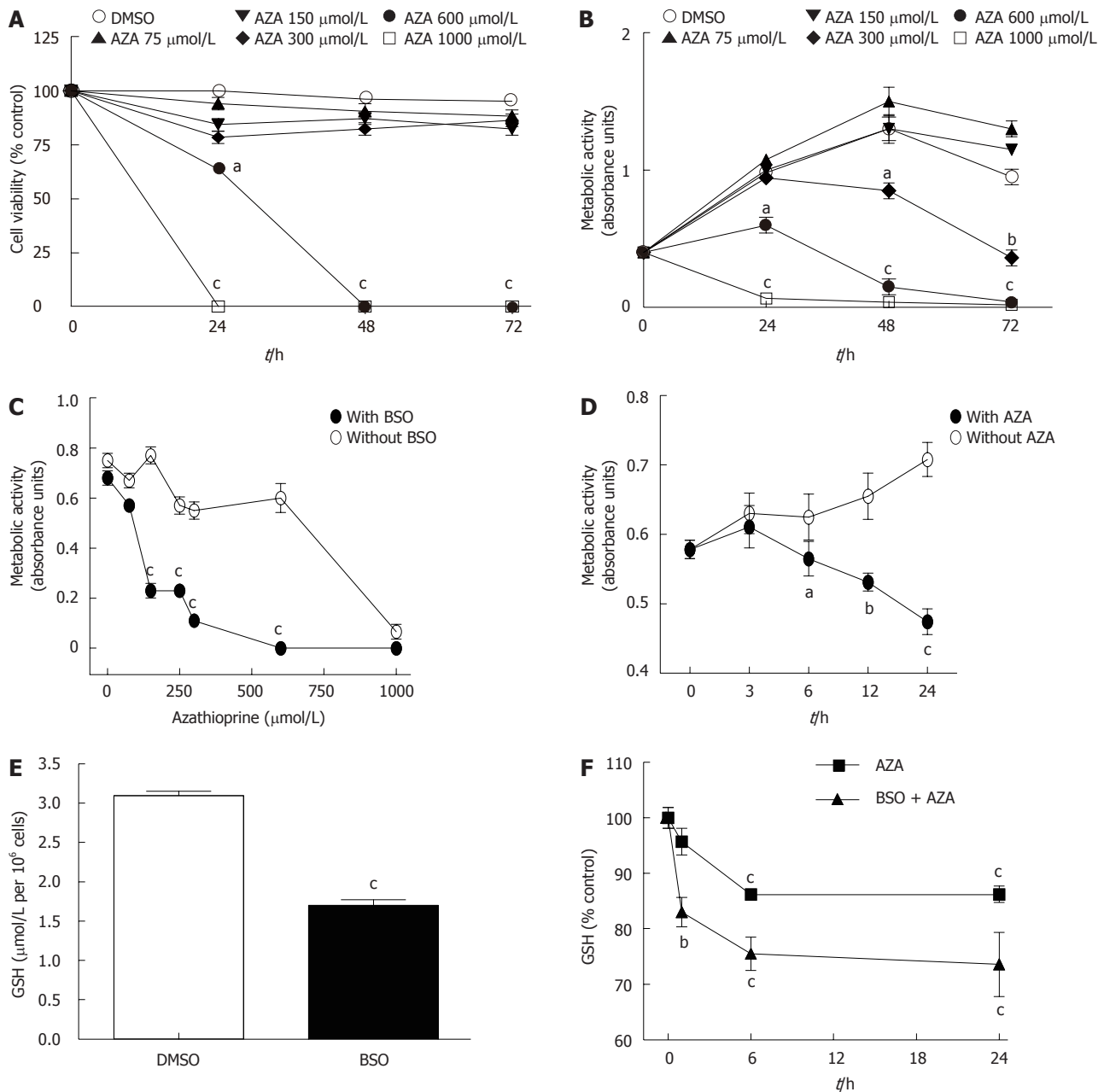
### Effect of AZA treatment on viability and metabolic activity of HepG2 cells

We treated HepG2 cells for 24 h, 48 h or 72 h with DMSO (0.2%) or AZA (75, 150, 300, 600 or 1000 μmol/L) dissolved in 0.2% DMSO. Figure 1A shows that AZA decreased cell viability (measured by Trypan blue exclusion assay) at 600 μmol/L and 1000 μmol/L without significant changes in cell viability at lower drug concentrations. Similarly, azathioprine significantly inhibited metabolic activity (measured by the MTT assay) in a dose- and time-dependent manner (Figure 1B). The metabolic activity was more sensitive to the effect of AZA than the cell viability. In fact with AZA at 300 μmol/L we observed a loss in metabolic activity without changes in cell viability compared with control cells (DMSO). The comparison of MTT and Trypan blue exclusion assays, suggest that AZA produced inhibition of cell proliferation and/or loss of mitochondrial activity up to 300 μmol/L and induced toxicity at higher concentrations (600 μmol/L and 1000 μmol/L). In any case, our results show that HepG2 cells are very resistant to AZA treatment unlike human hepatocytes in culture (data not shown).

### Sensitization of HepG2 cells to azathioprine by BSO pretreatment

When HepG2 cells were pretreated for 24 h with BSO (500 μmol/L) and then co-treated with AZA (0, 75 μmol/L, 150 μmol/L, 250 μmol/L, 300 μmol/L, 600 μmol/L or 1000 μmol/L) for 24 h (Figure 1C), metabolic activity noticeably decreased (IC<sub>50</sub> = 80 μmol/L) with respect to those cells treated with AZA alone (IC<sub>50</sub> = 800 μmol/L). The pretreatment with BSO potentiated the efficiency of azathioprine 10-fold in decreasing the metabolic activity of HepG2 cells. In the same way, HepG2 pretreated cells for 24 h with BSO (500 μmol/L) and then co-treated with AZA (100 μmol/L) for 3 h, 6 h, 12 h or 24 h showed a time-dependent inhibition of metabolic activity, in contrast to those cells that did not receive BSO (Figure 1D). Pretreatment with BSO significantly decreased basal levels of GSH (Figure 1E). Kinetic studies underlined that AZA treatment decreased GSH content in a time-dependent manner both in BSO-pretreated cells and in control cells (Figure 1F). However, the effect of AZA on GSH levels was higher in BSO-sensitized cells compared with control cells, which suggested that the compounds had synergic effects in regulation of GSH levels.

In order to localize the compartment affected by GSH depletion, we studied the presence of oxidized proteins (by OxyBlot) in different cellular fractions (cytosol, mitochondria and nucleus) obtained from drug-treated cells (Figure 2A). The treatment with AZA (300 μmol/L) plus BSO (500 μmol/L) increased the oxidized proteins



**Figure 1** Effect of azathioprine treatment in HepG2 cells and sensitization of HepG2 cells by buthionine sulfoximine pretreatment. A: Cell viability (by trypan blue exclusion assay); B: Metabolic activity (by MTT assay) of HepG2 cells treated at different times with dimethyl sulfoxide (DMSO) or azathioprine (AZA) at different concentrations; C: Metabolic activity of cultured HepG2 cells pretreated for 24 h without or with buthionine sulfoximine (BSO) (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and then cotreated with AZA at different concentrations for 24 h, or D with AZA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times; E: Glutathione (GSH) content of HepG2 cells pretreated for 24 h with DMSO or BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ); F: GSH content of HepG2 cells pretreated for 24 h with DMSO or BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and then cotreated with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) for different times. The significant differences with respect to control were statistically analyzed by analysis of variance with the Bonferroni post hoc test. <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> $P < 0.01$ ; <sup>c</sup> $P < 0.001$ .

in all fraction studied compared with cells treated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ). This effect was partially reversed by cotreatment with N-acetylcysteine (NAC, 1.5 mmol/L), a GSH replenisher. The levels of nucleoporin, PARP and cytochrome c were used as markers for the nucleus (nucleoporin and PARP) and mitochondria (cytochrome c). Interestingly, treatment with AZA plus BSO induced the depletion of nucleoporin and cytochrome c in the nucleus and in the mitochondria, respectively (Figure 2A). These effects were partially reversed by NAC.

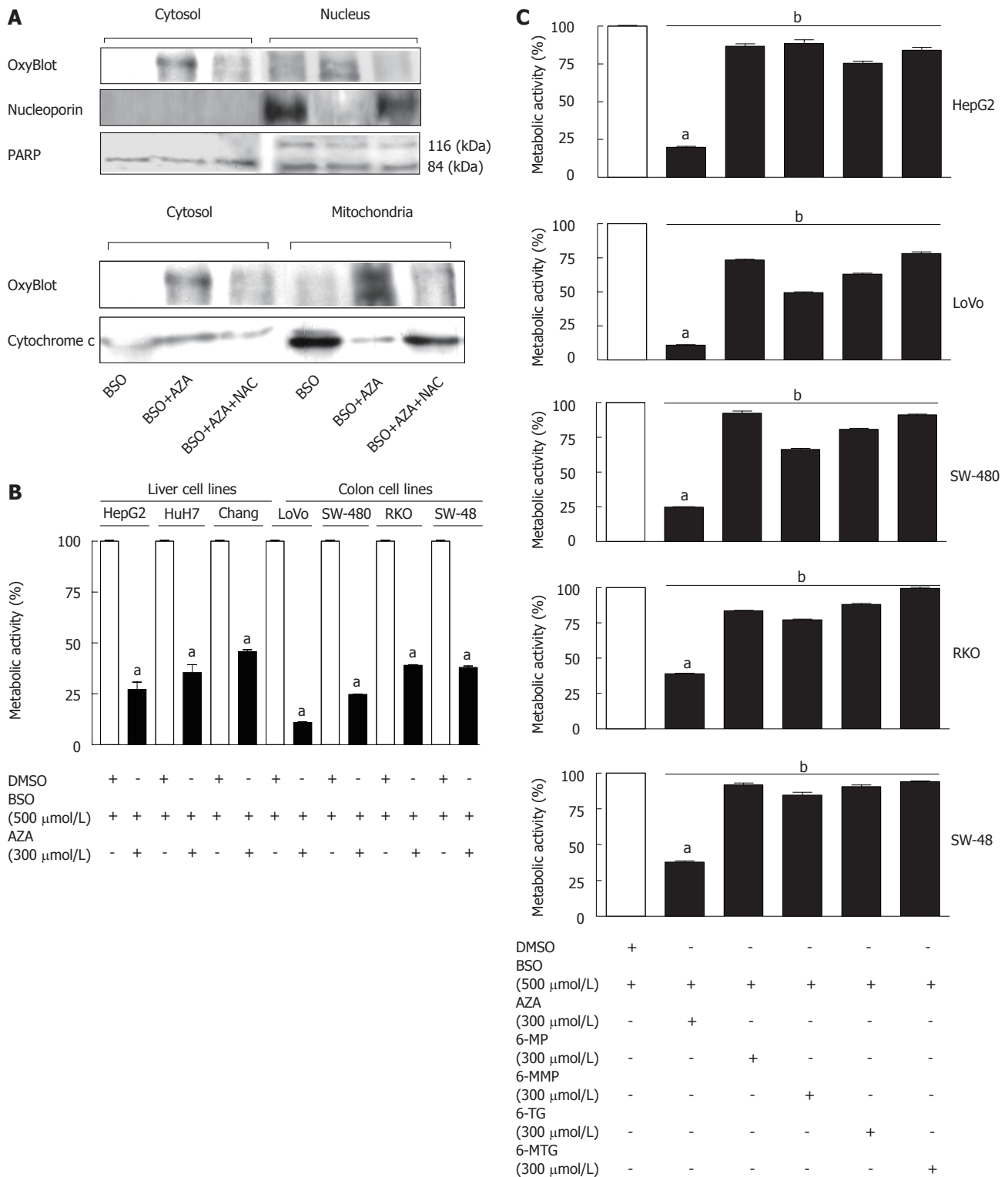
**Effect of AZA plus BSO combined on the metabolic activity of HCC cell lines and colon cancer lines**

Treatment with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) plus BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ), decreased the metabolic activity in all cell lines (HepG2, Huh-7, Chang cells, LoVo, SW-480, RKO, SW-48) tested in comparison with control treatment (DMSO) (Figure 2B).

**Effect of thiopurines plus BSO combined on the metabolic activity of HepG2 and colon cancer lines**

Pretreatment with BSO (24 h) and subsequent treatment

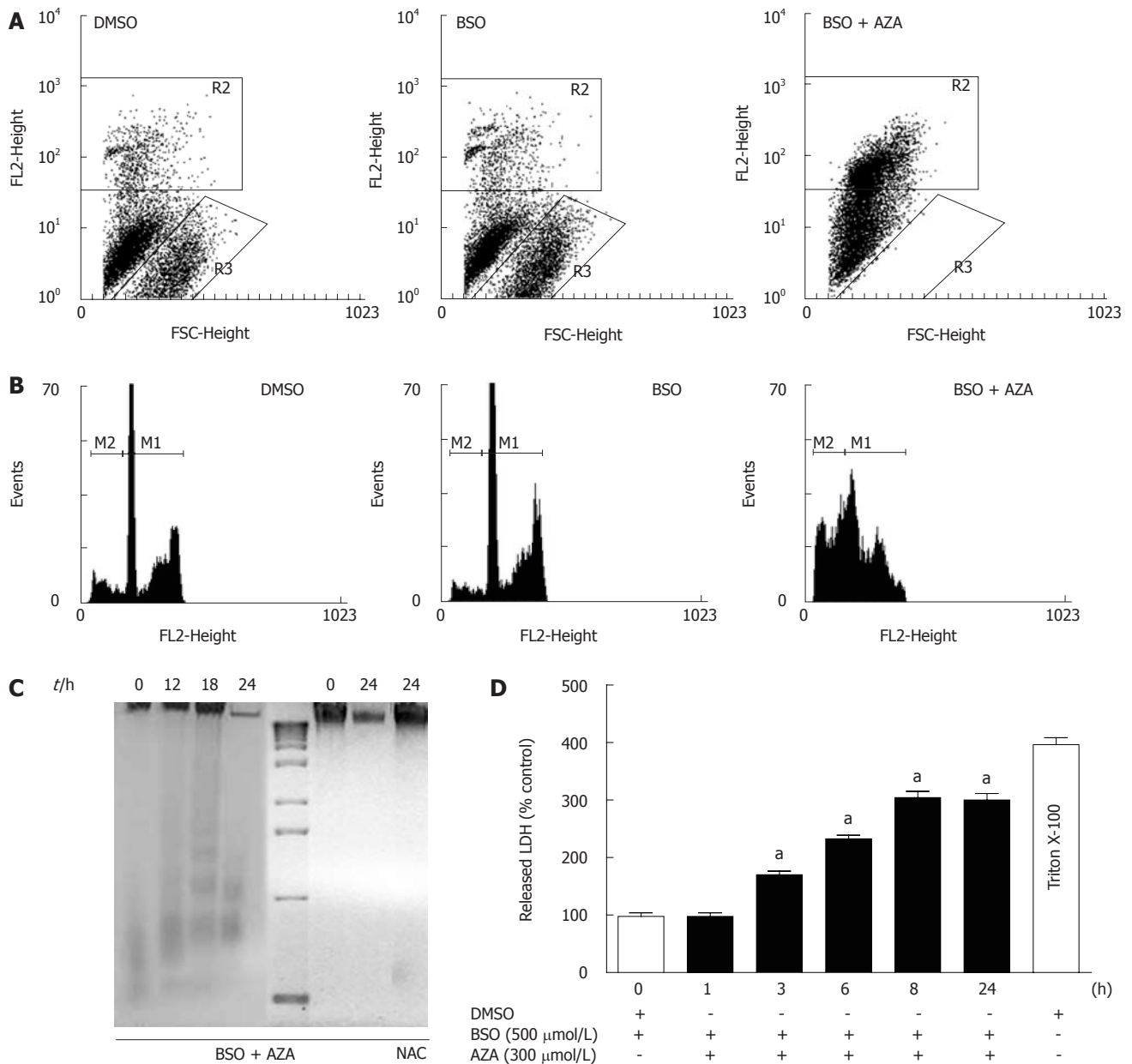




**Figure 2** Effect of the treatment with thiopurines plus buthionine sulfoximine in cancerous cell lines. A: Western blotting of several proteins from enriched fractions of cytosol, nucleus and mitochondria obtained from HepG2 cells pretreated with buthionine sulfoximine (BSO) (500 μmol/L, 24 h), or pretreated with BSO (500 μmol/L, 24 h) and then cotreated with azathioprine (AZA) (300 μmol/L) for 6 h with or without N-acetylcysteine (NAC) (1.5 mmol/L); B: Metabolic activity (by MTT assay) in different cancer cell lines from liver and colon pretreated with BSO (24 h) and then cotreated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or with AZA for 12 h; C: Metabolic activity (by MTT assay) in different cell lines pretreated with BSO (24 h) and then cotreated with AZA or with different thiopurines for 12 h. Significant differences with respect to control (DMSO plus BSO) were statistically analyzed by analysis of variance with the Bonferroni *post hoc* test. <sup>a</sup>*P* < 0.001, BSO plus AZA vs control. <sup>b</sup>*P* < 0.001, BSO plus AZA vs BSO plus different thiopurines.

with thiopurines (6-mercaptopurine, 6-methylmercaptopyrimidine, 6-thioguanine or 6-methylthioguanine) for

12 h caused a slight decrease in the metabolic activity of HepG2 cells with respect to control (cells treated with



**Figure 3** Effect of azathioprine plus buthionine sulfoximine treatment on cell viability, DNA fragmentation and lactate dehydrogenase release. A: Cell viability of HepG2 cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) (24 h), buthionine sulfoximine (BSO) (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) or pretreated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) and then cotreated with azathioprine (AZA) (300  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h); B: Study of cell cycle of HepG2 cells treated in the same conditions; C: DNA fragmentation of HepG2 cells pretreated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) and then cotreated with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times with or without N-acetylcysteine (NAC) (1.5 mmol/L); D: Time course of lactate dehydrogenase (LDH) released by HepG2 cells pretreated with BSO (24 h) and then cotreated with AZA at different times. Triton X-100 (0.2%) used as control. Significant differences with respect to control (DMSO plus BSO) were statistically analyzed by analysis of variance with the Bonferroni *post hoc* test.  $^{\#}P < 0.001$ .

BSO) (Figure 2C); the effect of the preceding treatment with thiopurines on metabolic activity was very modest compared with the effect of AZA (Figure 2C). We observed significant differences between AZA and the other thiopurines studied. Subsequent studies were performed using AZA.

**Effect of AZA plus BSO on necrosis and apoptosis parameters**

Pretreatment of HepG2 cells for 24 h with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and subsequent treatment with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ )

for 24 h resulted in a significant loss of cell viability with respect to cells treated with BSO or with DMSO, as measured by staining of live cells with propidium iodine (Figure 3A). The R3 area corresponded to viable cells and R2 to non viable cells. Pretreatment of HepG2 cells with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) did not significantly change their viability compared with DMSO-treated cells (Figure 3A). To determine the mode of cell death, cell cycle analysis was performed by staining Triton X-100 permeabilized cells with propidium iodine followed by flow cytometry analysis (Figure 3B). In the presence of BSO

(500  $\mu\text{mol/L}$ ) and AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ), we observed a significant increase in the sub-G1 population (M2) with respect to cells treated with BSO or with DMSO alone. No significant differences were observed between cells treated with DMSO or with BSO (Figure 3B). These data suggested that the significant decrease in both metabolic activity and viability of cells treated with BSO and AZA was due in part to an increase in nuclear fragmentation characteristic of late apoptosis and early necrosis. To quantify the contribution of apoptosis and necrosis in cell death induced by BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) plus AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ), we studied oligonucleosomal DNA fragmentation (Figure 3C) and LDH release (Figure 3D), respectively. The combined drug treatment induced a slight DNA laddering at 18 h treatment. After this period of time, treatment with BSO plus AZA induced extensive DNA degradation which was characteristic of necrosis. This degradation was prevented by the presence of NAC (1.5 mmol/L) (Figure 3C). Next we studied LDH release (Figure 3D). Our results showed that LDH release was statistically significant after 3 h combined drug treatment compared with control treatment. After 8 h treatment in the same conditions, we observed approximately 75% of necrotic cell death compared with control necrosis (HepG2 cells in the presence of Triton X-100) (Figure 3D). To obtain a new insight in the role of mitochondria in the cell death induced by the combination of BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and AZA (150  $\mu\text{mol/L}$  or 300  $\mu\text{mol/L}$ ), we evaluated: (1) annexin V bound to phosphatidylserine on the surface of Hep G2 cells; and (2) the mitochondrial functionality through JC-1 probe aggregation. Figure 4 shows that treatment of cells with BSO plus AZA: (1) increased the percentage of cells positive for annexin V (Q2 quadrant) in a dose-dependent manner: from 37% in control cells (DMSO), to 64% in cells treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  BSO plus 150  $\mu\text{mol/L}$  AZA, then to 92% in cells treated with 500  $\mu\text{mol/L}$  BSO plus 300  $\mu\text{mol/L}$  AZA; and (2) decreased the percentage of cells with intact mitochondrial membrane potential, in a dose-dependent manner: from 85% in control cells (DMSO) to 68% in 500  $\mu\text{mol/L}$  BSO plus 150  $\mu\text{mol/L}$  AZA, then to 2% in 500  $\mu\text{mol/L}$  BSO plus 300  $\mu\text{mol/L}$  AZA. Annexin V staining was calculated as a percentage of R1 (cells with the mitochondrial membrane potential intact). R2 represented cells without an intact membrane potential mitochondrial. We obtained very similar proportions of cells stained with annexin V and JC-1 after treatment with DMSO (control cells) or with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) (data not shown).

It is very interesting to emphasize the recovery effect of NAC. Cells treated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) in the presence of NAC (1.5 mmol/L) showed a larger percentage of cells with intact mitochondrial membrane potential (68%) than cells treated with BSO and AZA in the absence of NAC (2%). However, a high percentage (82%) of annexin V-positive cells were observed in the NAC-treated cells, which suggest that they were at the beginning of apoptosis (Figure 4).

### Effect of AZA plus BSO in cellular signaling

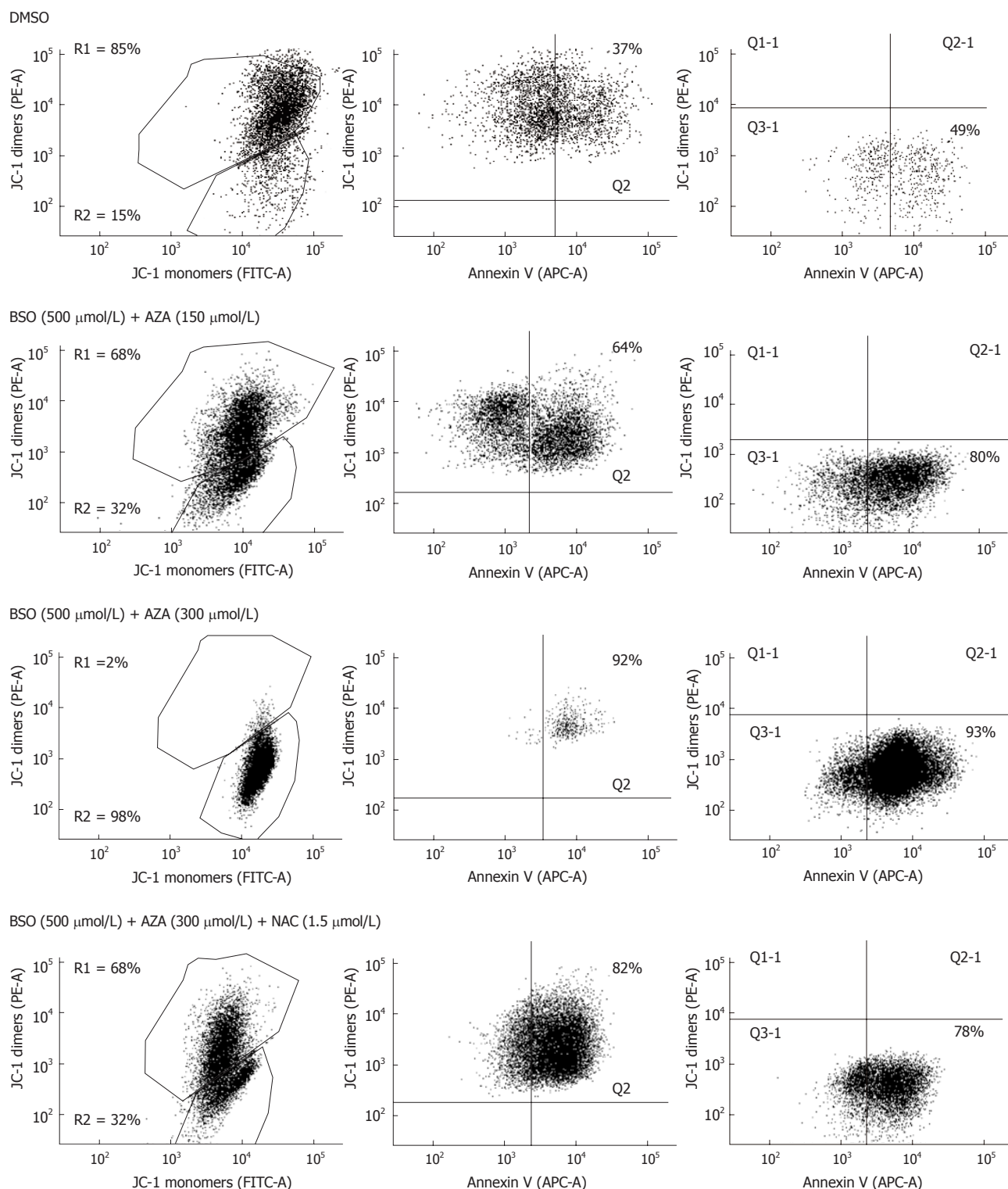
HepG2 cells were pretreated for 24 h with MEM or BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ), then were treated with or without SP600125 (a JNK specific inhibitor) or SB203580 (a p38 specific inhibitor), in the presence or in the absence of AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) for 1 h (Figure 5A). In contrast to BSO, treatment with AZA induced p38 phosphorylation, which indicated enzyme activation. This effect increased in those cells treated with both AZA and BSO, and JNK1/JNK2 phosphorylation was also observed. The treatment of cells with SB203580 decreased both p38 and JNK1/JNK2 phosphorylation. SP600125 decreased JNK1/JNK2 phosphorylation and also p38 phosphorylation, which suggests a linked control mechanism between both pathways. On the other hand, NAC treatment inhibited both p38- and JNK1/JNK2-induced phosphorylation by AZA and BSO (Figure 5A).

In the next set of experiments (Figure 5B), we pretreated HepG2 cells for 24 h with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) and then with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times (1, 3, 6, 8, 12 h), and we found that Bad, Bid and Bcl-2 remained constant, but Bax increased at 1 h and 3 h. There was general protein degradation at 24 h of treatment that affected Bad, Bid and  $\beta$ -tubulin (Figure 5B). Also we studied cytochrome c release from mitochondria. The maximum release of occurred at 3 h of AZA treatment and was attenuated by co-treatment with NAC (1.5 mmol/L) (Figure 6A). Next we examined the oxidation of proteins, with "OxyBlot kit", in cells pretreated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h and co-treated with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times. The experiment showed oxidation of 53 kDa and 67 kDa bands at 6 h, but after this period of time, we observed decreased protein oxidation (Figure 6B). The protein oxidation was reversed by NAC (Figure 6D).

We studied the proteolysis of procaspase-3, GCS and PARP by Western blotting (Figure 6B). Pretreatment with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) and then cotreatment with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times, induced procaspase-3 dimerization (65 kDa band) but we did not observe fragmentation. The substrates of caspase-3, GCS and PARP, were fragmented with the combined treatment of BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) plus AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) (Figure 6B), however their proteolysis profiles did not correlate with those obtained in a classical model of caspase-3 activation, as observed for Hep G2 cells treated with actinomycin D (0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) plus tumor necrosis factor- $\alpha$  (35 pmol/L) for 18 h (Figure 6C). We observed that NAC inhibited the proteolysis of procaspase-3, GCS and PARP induced by AZA plus BSO (Figure 6E). However, Z-VAD-mfk (a caspase-3 inhibitor) did not have any significant effect on proteolysis of procaspase-3, GCS and PARP (Figure 6E). The protective role of GSH in Hep G2 cell death induced by BSO plus AZA treatment and the absence of caspase-3 activation in this model is shown in Table 1.

### Effect of AZA plus BSO in the development of the xenograft in nude mice

HepG2 cells were subcutaneously injected into nude mice,

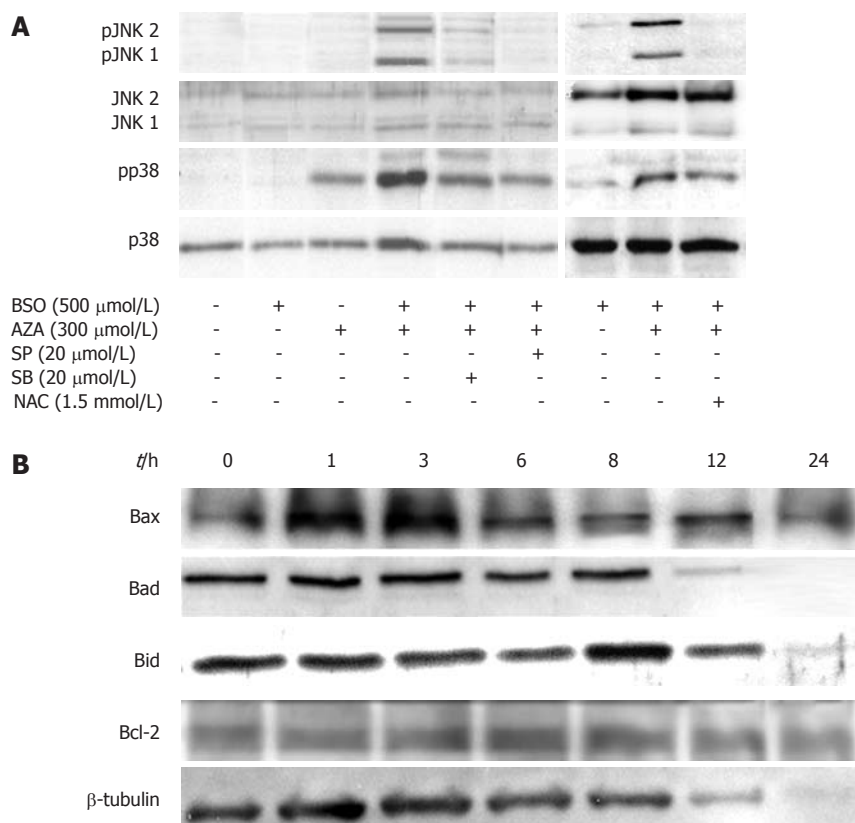


**Figure 4** Analysis by flow cytometry of HepG2 cells apoptosis (annexin V) and of mitochondrial functionality (JC-1). Cells treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) (24 h), or pretreated with buthionine sulfoximine (BSO) (24 h) and then cotreated with azathioprine (AZA) (24 h) in absence or presence of N-acetylcysteine (NAC). This experiment is representative of three others with similar results.

and the tumor size was measured every day. From the 7th day of BSO (90 mg/kg per day) plus AZA (6 mg/kg per day) treatment, the tumor volume was significantly decreased by a mean of 35% when compared with vehicle, DMSO (Figure 7A). These results showed no statistically significant differences ( $P > 0.05$ ) between control (DMSO)

and BSO (90 mg/kg per day) treatment or between control (DMSO) and AZA (6 mg/kg per day) treatment (Figure 7A). GSH levels decreased in the tumors in BSO and AZA plus BSO groups compared with the corresponding control group (DMSO) (Figure 7C). Tumor cytolysis in the AZA plus BSO group was accompanied by a signifi-





**Figure 5** Effect of azathioprine plus buthionine sulfoximine treatment on cellular signaling. A: Stress activated kinases from HepG2 cells pretreated with buthionine sulfoximine (BSO) (24 h) and then cotreated with different combinations of azathioprine (AZA) with SP600125, SB203580 or N-acetylcysteine (NAC) for 1 h; B: Time course of mitochondrial regulatory proteins from HepG2 cells pretreated with BSO (500 μmol/L, 24 h) and then treated with AZA (300 μmol/L) at different times. This set of experiments is representative of three others with similar results.

**Table 1** HepG2 cells metabolic activity and caspase-3 activity

	Metabolic activity (absorbance units)	Caspase-3 activity (% of CRL)			
		0 h	6 h	12 h	18 h
BSO/DMSO	0.833 ± 0.016	100.00 ± 6.62	-	-	-
BSO/AZA	0.544 ± 0.046 <sup>a</sup>	-	95.87 ± 8.56	92.79 ± 6.09	-
BSO/AZA/NAC	0.933 ± 0.059	-	93.29 ± 4.03	98.87 ± 2.64	-
BSO/AZA/Z-VAD-mfk	0.680 ± 0.034 <sup>a</sup>	-	94.85 ± 6.81	102.60 ± 7.30	-
TNF-α (35 pmol/L)/ActD (0.8 μmol/L)	-	-	-	-	143.00 ± 5.77 <sup>b</sup>
TNF-α (700 pmol/L)/ActD (0.8 μmol/L)	-	-	-	-	141.30 ± 4.33 <sup>b</sup>

Cells were treated with buthionine sulfoximine (BSO) (500 μmol/L, 24 h), or pretreated with BSO (500 μmol/L, 24 h) and then cotreated for 12 h with: (1) azathioprine (AZA) (300 μmol/L), (2) AZA (300 μmol/L) plus N-acetylcysteine (NAC) (1.5 μmol/L) or (3) AZA (300 μmol/L) plus Z-VAD-mfk (50 μmol/L). tumor necrosis factor (TNF)-α plus actinomycin D (ActD) treatment for 18 h was used as a positive control (CRL). Significant differences with respect to control [(BSO plus dimethyl sulfoxide (DMSO))] were statistically analyzed by analysis of variance. <sup>a</sup>*P* < 0.05; <sup>b</sup>*P* < 0.05.

**Table 2** Summary of enzyme levels in mice

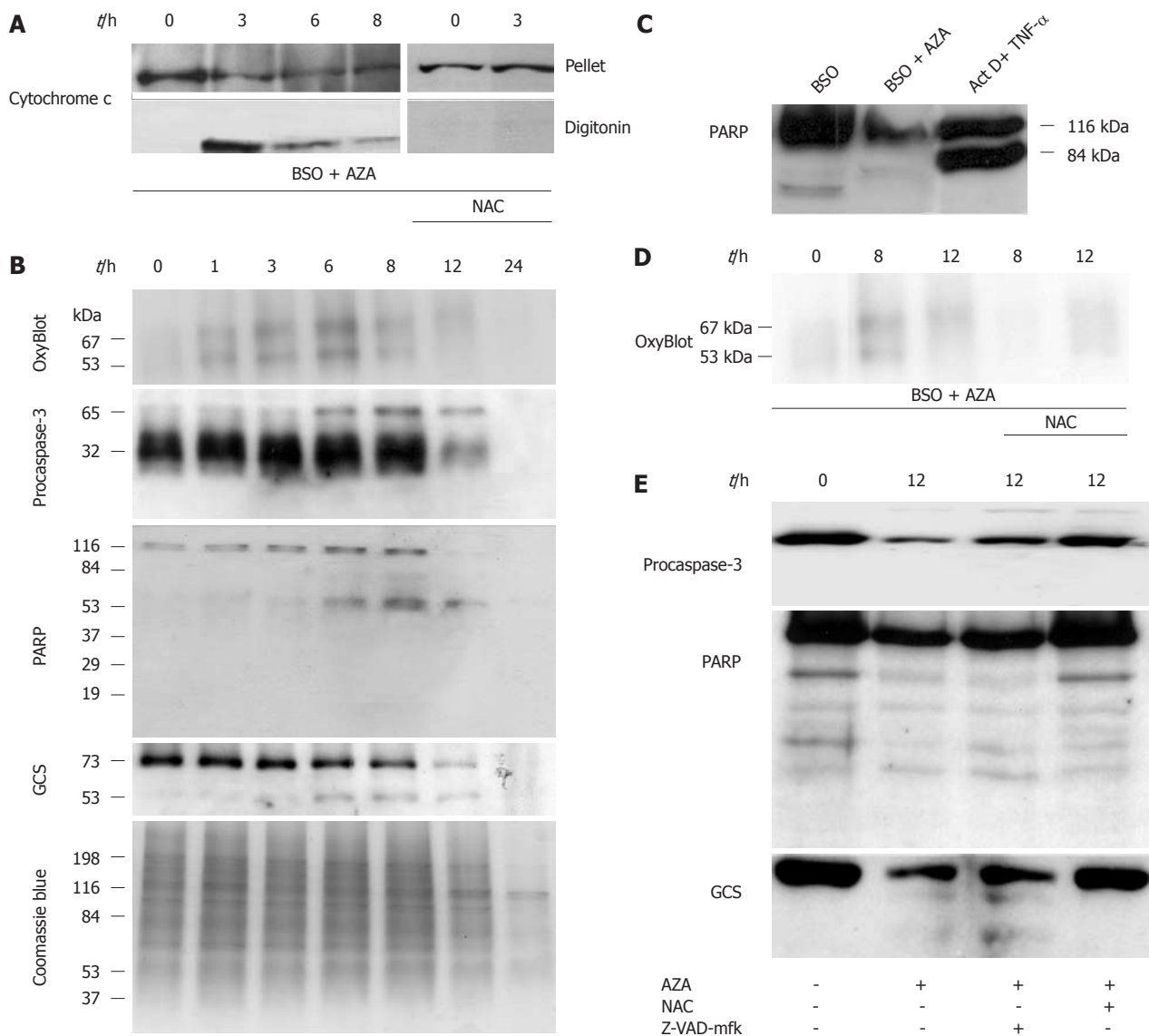
Enzyme	DMSO	BSO	AZA	BSO/AZA
AST (IU/L)	91.07 ± 8.36	62.79 ± 3.89	124.90 ± 10.56	154.30 ± 19.75 <sup>a</sup>
ALT (IU/L)	31.50 ± 9.12	22.36 ± 2.85	36.17 ± 5.44	42.29 ± 9.04
CK (IU/L)	598.60 ± 112.10	416.00 ± 89.28	904.40 ± 129.40	918.50 ± 128.70

Enzyme activity of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and creatine kinase (CK) in plasma of nude mice transplanted with HepG2 cells at the end of the experiment (12 d of treatment in similar conditions as in Figure 7). Significant differences with respect to control animals [dimethyl sulfoxide (DMSO)] were statistically analyzed by analysis of variance. <sup>a</sup>*P* < 0.001. BSO: Buthionine sulfoximine; AZA: Azathioprine.

cant reduction in procaspase-3 compared with control (DMSO) (Figure 7D). Plasma creatine kinase, ALT and AST did not show marked changes in the AZA plus BSO group compared with control (DMSO) and with the other groups studied (Table 2). This implied that a combination of AZA plus BSO did not induce toxicity in the hosts.

## DISCUSSION

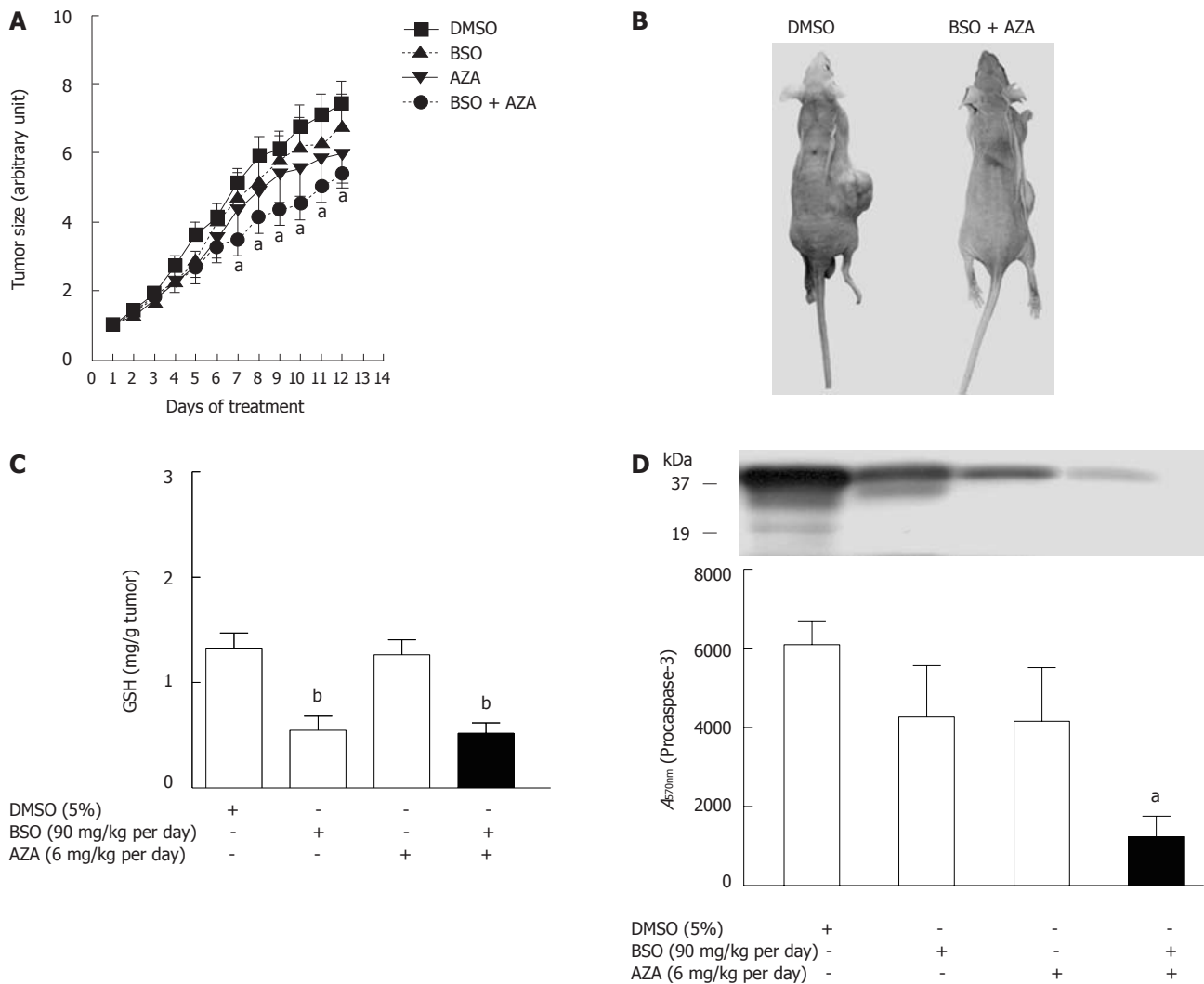
New drug combinations are needed for treatment of patients with cancer, particularly those refractory to stan-



**Figure 6** Effect of azathioprine plus buthionine sulfoximine treatment on biochemical markers of apoptosis. A: Time course of cytochrome c release from HepG2 cells pretreated with buthionine sulfoximine (BSO) (500  $\mu\text{mol/L}$ ) during 24 h and then cotreated with azathioprine (AZA) (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times. N-acetylcysteine (NAC) (1.5 mmol/L) was added at the same time as AZA; B: Time course of apoptosis-related proteins in HepG2 cells pretreated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h and then cotreated with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ ) at different times; C: Western blotting of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) from HepG2 cells treated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h), or pretreated with BSO (500  $\mu\text{mol/L}$ , 24 h) and then cotreated with AZA (300  $\mu\text{mol/L}$ , 12 h). HepG2 cells treated with actinomycin D (0.8  $\mu\text{mol/L}$ ) plus tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (35 pmol/L) for 18 h were used as positive control; D: Time course of the oxidized proteins from HepG2 cells treated in similar conditions as in panel A; E: Time course of apoptosis-related proteins from HepG2 cells treated in similar conditions as in panel A. NAC (1.5 mmol/L) or Z-VAD-mfk (50  $\mu\text{mol/L}$ ) were added at the same time as AZA. This set of experiments is representative of three others with similar results.

dard therapy. **Unresectable HCC is treated by TACE**<sup>[3,13]</sup>, in which tumor necrosis is induced by hypoxia and by classic (doxorubicin, epirubicin, mitomycin c, cisplatin or 5-fluorouracil) or new (zinostatin stimalamer) drugs<sup>[13]</sup>. Our preclinical results suggest that a new combination of old drugs could be useful in locoregional treatment of HCC. The AZA plus BSO combination offers the advantage of a new mechanism of action to the previous one used in TACE therapy, as we showed in the present paper. Moreover, our results revealed that AZA plus BSO may have a new spectrum of activity in comparison with the parent molecules, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. The localized application of AZA (6 mg/kg per day) and BSO (90 mg/kg per day)

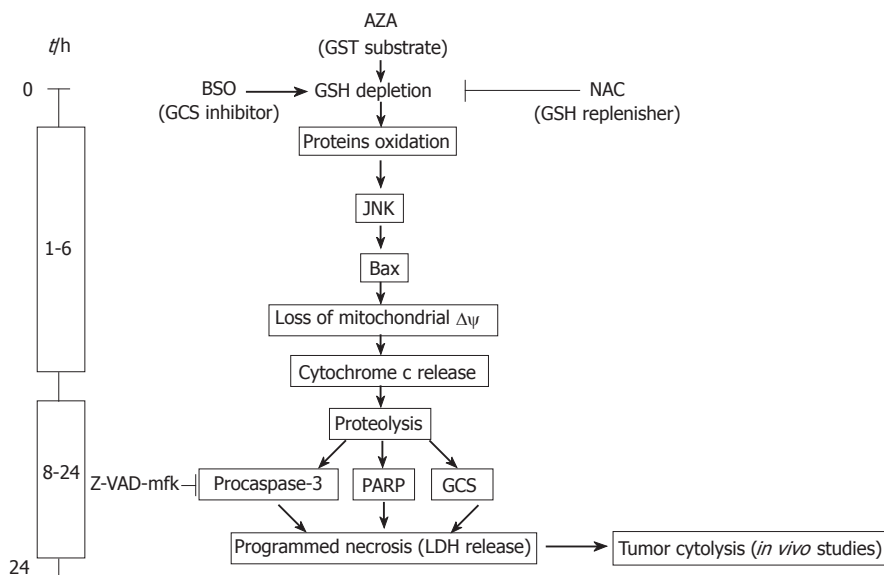
produced a decrease in the volume of the HepG2 tumor xenograft that was not achieved by AZA or BSO alone. The doses used in the nude mouse model are comparable to those used for AZA in liver transplantation<sup>[14]</sup> and in clinical trials of BSO<sup>[7]</sup>. The therapeutic effect was produced with only minor changes in biochemical parameters used in the evaluation of the drug safety profile. Our results suggested that the AZA plus BSO combination induced necroptosis by JNK activation. Necroptosis is a caspase-independent regulated cell death, that results in morphological features resembling necrosis. Our data suggested that AZA and BSO can induce HepG2 cell death by depletion of the different pools of GSH, which could explain the synergistic effect of the compounds on



**Figure 7 Effect of azathioprine plus buthionine sulfoximine treatment on tumor volume of nude mice.** A: Inhibition of tumor growth by buthionine sulfoximine (BSO) (90 mg/kg per day) plus azathioprine (AZA) (6 mg/kg per day), AZA (6 mg/kg per day) or BSO (90 mg/kg per day). HepG2 cells (10<sup>7</sup>) were implanted subcutaneously into nude mice as described in Materials and Methods; B: Representative animals of the groups treated with dimethyl sulfoxide (DMSO) or BSO plus AZA after 12 d of treatment. Levels of glutathione (GSH) (C) and of procaspase-3 (D) in the tumors of nude mice after 12 d of treatment with the corresponding drugs. There were eight mice in each group. Data points represent the mean  $\pm$  SE. <sup>a</sup>*P* < 0.05; <sup>b</sup>*P* < 0.01.

cell cytotoxicity. This suggestion is based on: (1) AZA decreases GSH levels in pretreated cells with BSO; (2) AZA kinetics on GSH depletion is more rapid and profound in cells pretreated with BSO than in control cells; (3) AZA is able to activate p38 by a GSH-dependent mechanism, while BSO is not; (4) AZA is able to stimulate JNK activity in cells GSH-depleted by BSO; this last effect is completely reversed by NAC; (5) AZA is able to stimulate the oxidation of cytosolic, nuclear and mitochondrial proteins by a GSH-dependent mechanism as demonstrated by the reversal by NAC; and (6) AZA treatment depletes both nucleoporin and cytochrome c in cells pretreated by BSO; these effects are reversed by NAC. From kinetic studies, we suggest that GSH depletion induced by AZA plus BSO stimulates JNK, Bax translocation and subsequent deregulation of mitochondria and activation of a cytotoxic cascade in HepG2 cells. The mitochondrial crisis is demonstrated by cytochrome c release and an increase in oxidized proteins. Classically, a link has been

observed between mitochondria and caspase-3 activation<sup>[15]</sup>. Our results demonstrated the proteolysis of procaspase-3, PARP,  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, the loss of membrane integrity, the release of LDH and DNA degradation after treatment with AZA plus BSO. Several of these cellular and biochemical changes are characteristic of apoptosis and of necrosis. We observed (Figure 8) at short times (0 to 6 h) of drug treatment, rapid regulatory changes associated with GSH levels, such as JNK activation and Bax translocation, which are followed by mitochondrial cytochrome c release and protein oxidation, all parameters classical hallmarks of apoptosis. However, cytochrome c release did not lead to caspase-3 activation and subsequent PARP proteolysis in 89 kDa fragments, as observed in control experiments performed in the presence of tumor necrosis factor- $\alpha$  and actinomycin-D. In addition, caspase-3 activity did not increase in the presence of BSO plus AZA. The absence of caspase-3 activation is corroborated using Z-VAD-mfk, because this caspase-3 in-



**Figure 8** Time course of the events in our molecular model. AZA: Azathioprine; GST: Glutathione-S-transferase; GSH: Glutathione; GCS:  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase; BSO: Buthionine sulfoximine; NAC: N-acetylcysteine; PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase; LDH: Lactate dehydrogenase.

hibitor did not protect against AZA plus BSO-induced cytotoxicity. These data exclude the involvement of caspase-3 in the cell death induced by the combination of both compounds. We observed at longer periods (6 to 24 h) of treatment with both compounds (Figure 8), a generalized protein degradation which affected structural ( $\beta$ -tubulin), regulatory (Bad, Bid, procaspase-3), metabolic (GCS) and DNA binding (PARP) proteins. Interestingly, Bcl-2 levels did not change with AZA plus BSO treatment which rules out apoptosis as the mechanism of cell death. Recently, a novel form of cell death called necroptosis or programmed necrosis has been proposed<sup>[15]</sup>, which like apoptosis, can be executed by a regulated mechanism. The first steps are common or similar to apoptosis but the inactivation of caspases causes a shift from apoptosis to mixed cell death (necrotic/apoptotic) or to full-blown necrosis<sup>[15]</sup>. Our results suggest a role for GSH in the shift between apoptosis and necrosis induced by AZA plus BSO, because the addition of NAC to the drug combination reversed the majority of the cytotoxic effects induced by AZA plus BSO (JNK activation, cytochrome c release, protein oxidation, extensive proteolysis, mitochondrial membrane depolarization, and DNA fragmentation), but it did not inhibit annexin V-staining, which is characteristic of the early step of apoptosis. Recently, the importance of GSH has been shown in the induction of cell death by regulation of the cascade GST-JNK. The JNK activity is inhibited by binding with GST and, in this molecular model, a decrease in GSH causes oxidation of Cys47 and Cys101 in the GST protein, which in turn induces JNK release and subsequent activation<sup>[16]</sup>. Our results suggest a similar model of activation of JNK by AZA plus BSO. In contrast, JNK activation in HepG2 cells by staurosporin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, etoposide or ultraviolet light induces classical apoptosis<sup>[17]</sup>. In some instances, it may be desirable to trigger necrotic cell death, for example in hepatocarcinoma treatment, necrosis is the target of all

effective locoregional therapies<sup>[3]</sup>. Our results provide important insights for the comprehensive understanding of the mechanism cell death induced by AZA and BSO in HepG2 cells and in other cancerous cells from the liver (HuH7, Chang cells) and from the colon (LoVo, SW-48, RKO, SW-48). To be considered as a therapeutic agent, the administered doses of AZA plus BSO must be compatible with those used in clinical practice; in this respect we observed that the doses of both compounds locally injected in the xenograft were able to reduce the tumor volume without any serious side effects. This combined therapy has an additional advantage, in that the presence of NAC can protect major organs from unexpected damage. The effectiveness of BSO in the treatment of solid tumors has been observed previously in combination with arsenic trioxide<sup>[18]</sup>, sodium borocaptate<sup>[19]</sup> or melphalan<sup>[6]</sup>. Interestingly, in this last paper BSO was administered efficiently by infusion into the hepatic artery, as in TACE. Our results provide experimental evidence to support the clinical use of the combined treatment of AZA and BSO in liver cancer.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Lasuncion and Dr. Roperro for kindly providing some cell lines. We thank Unidad de Cultivos Celulares and Centro de Experimentación Animal for their technical help.

## COMMENTS

### Background

The incidence of human liver carcinoma is increasing and is the fifth most common cancer in the world. Unfortunately, the disease is often diagnosed too late. For unresectable liver carcinoma, an effective treatment is transarterial chemoembolization (TACE). One way to progress with this encouraging treatment is to find a synergistic combination of classical drugs.



### Research frontiers

One of the problems in treating hepatocarcinoma is chemoresistance, thus the majority of systemic therapies have been disappointing. Researchers for years have observed that elevation of intracellular glutathione (GSH) has been associated with resistance to irradiation and to chemotherapy and correspondingly the diminution of GSH levels is associated with sensitization to both types of therapy. Buthionine sulfoximine (BSO) is a competitive inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase, the rate-limiting step in the biosynthetic pathway of GSH production, and reduces their levels. In this study, the authors demonstrate that azathioprine (AZA) plus BSO could induce: (1) cell death of several cancer lines *in vitro* by activation of JNK; and (2) HepG2 cell death in a xenograft model.

### Innovations and breakthroughs

The results point out the role of GSH in the synergism observed by the combination of AZA plus BSO, because the addition of N-acetylcysteine (NAC) reversed JNK activation, cytochrome c release, protein oxidation, extensive proteolysis, mitochondrial membrane depolarization and DNA fragmentation observed in the presence of AZA plus BSO. However, NAC was not able to inhibit annexin V staining which is characteristic of the early step of apoptosis. The modulation of the shift between apoptosis and necrosis induced by AZA plus BSO, in the presence or in absence, respectively, of NAC may be important in overcoming the chemoresistance observed during treatment of liver tumors.

### Applications

The present findings may provide: (1) a new drug combination for the treatment of liver neoplasms; (2) identification of molecular targets to inhibit chemoresistance of cancer. These two pathways could be promising in the treatment of liver cancer.

### Terminology

AZA is an immunosuppressant for clinical use belonging to the family of the thiopurines. It is used in organ transplantation and treatment of autoimmune diseases. BSO is an inhibitor of glutathione synthesis that is being evaluated clinically as an adjuvant in the treatment of cancer.

### Peer review

The paper is of interest and deserves consideration for publication.

## REFERENCES

- 1 Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin Liver Dis* 2010; **30**: 3-16
- 2 Schreiber IR, Bejarano P, Martinez EJ, Reggev A. Very late recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: case report and literature review. *Transplant Proc* 2006; **38**: 3140-3143
- 3 Forner A, Ayuso C, Varela M, Rimola J, Hessheimer AJ, de Lope CR, Reig M, Bianchi L, Llovet JM, Bruix J. Evaluation of tumor response after locoregional therapies in hepatocellular carcinoma: are response evaluation criteria in solid tumors reliable? *Cancer* 2009; **115**: 616-623
- 4 Awasthi YC, Chaudhary P, Vatsyayan R, Sharma A, Awasthi S, Sharma R. Physiological and pharmacological significance of glutathione-conjugate transport. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; **12**: 540-551
- 5 Cara CJ, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteso M, Hinojosa J, García-Paredes J, Guijarro LG. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 2004; **10**: RA247-RA254
- 6 Vahrmeijer AL, van Dierendonck JH, Schutrups J, van de Velde CJ, Mulder GJ. Potentiation of the cytostatic effect of melphalan on colorectal cancer hepatic metastases by infusion of buthionine sulfoximine (BSO) in the rat: enhanced tumor glutathione depletion by infusion of BSO in the hepatic artery. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; **44**: 111-116
- 7 Bailey HH, Ripple G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Mahvi D, Schink J, Pomplun M, Mulcahy RT, Wilding G. Phase I study of continuous-infusion L-S-R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst* 1997; **89**: 1789-1796
- 8 Abe K, Matsuki N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. *Neurosci Res* 2000; **38**: 325-329
- 9 Shin KJ, Bae SS, Hwang YA, Seo JK, Ryu SH, Suh PG. 2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl induces apoptosis in human monocytic cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; **169**: 1-7
- 10 Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* 1976; **74**: 214-226
- 11 Cuevas EP, Escribano O, Chiloeches A, Ramirez Rubio S, Román ID, Fernández-Moreno MD, Guijarro LG. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol* 2007; **46**: 1089-1098
- 12 Cuevas EP, Escribano O, Monserrat J, Martínez-Botas J, Sánchez MG, Chiloeches A, Hernández-Breijo B, Sánchez-Alonso V, Román ID, Fernández-Moreno MD, Guijarro LG. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate-4 enhances actinomycin D- and tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced cell death in hepatocarcinoma cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2009; **108**: 1292-1301
- 13 Okusaka T, Kasugai H, Shioyama Y, Tanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial. *J Hepatol* 2009; **51**: 1030-1036
- 14 Zekry A, Gleeson M, Guney S, McCaughan GW. A prospective cross-over study comparing the effect of mycophenolate versus azathioprine on allograft function and viral load in liver transplant recipients with recurrent chronic HCV infection. *Liver Transpl* 2004; **10**: 52-57
- 15 Pradelli LA, Bénétteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 2010; **67**: 1589-1597
- 16 Townsend DM, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ, Tew KD. Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 2009; **284**: 436-445
- 17 Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; **281**: 21256-21265
- 18 Maeda H, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Takechi Y, Ogawa O, Kakizuka A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 2004; **11**: 737-746
- 19 Yoshida F, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A. Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model. *Cancer Lett* 2008; **263**: 253-258

S- Editor Tian L L- Editor Cant MR E- Editor Zhang DN

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 396 108**

21 Número de solicitud: 201131315

51 Int. Cl.:

**A61K 31/52** (2006.01)

**A61K 31/198** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**29.07.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**19.02.2013**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (95.0%)**

**Plaza de San Diego, s/n.**

**28801 ALCALA DE HENARES (Madrid) ES y**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID (5.0%)**

72 Inventor/es:

**GONZALEZ GUIJARRO, Luis;**

**HERNANDEZ-BREIJO, Borja;**

**ROMAN CURTO, Irene De Los Dolores;**

**FERNANDEZ MORENO, María De Los Dolores y**

**PEREZ GISBERT, Javier**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **USO DE UNA COMBINACIÓN DE AZATIOPRINA Y L-BUTIONINA-[S,R]-SULFOXIMINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE UN TUMOR REFRACTARIO.**

57 Resumen:

La presente invención describe el uso de una combinación de azatioprina (AZA) y L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, preferiblemente cáncer. La combinación de la invención se ha mostrado como especialmente eficiente respecto de la técnica en particular en el tratamiento de tumores sólidos de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado, tumores que presentan gran resistencia a la quimioterapia. La invención también protege la composición farmacéutica en la que se presenta la combinación y el kit que contiene dicha composición.

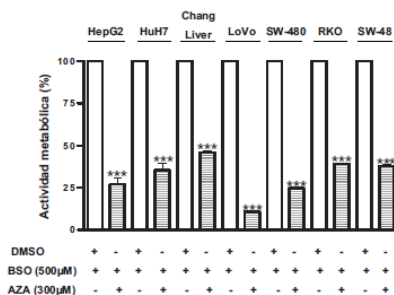


Fig. 6

**DESCRIPCIÓN**

Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario

**CAMPO DE LA INVENCION**

- 5 La presente invención describe la combinación sinérgica de azatioprina (AZA) y L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) para uso en terapia combinada para el tratamiento y/o quimiosensibilización de tumores refractarios a la quimioterapia convencional. Se encuadra dentro del tratamiento del cáncer por quimioterapia, en el campo de la biomedicina.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

- 10 La familia de fármacos conocida como tiopurinas está constituida por el profármaco azatioprina (AZA), 6-mercaptopurina (6-MP) y 6-tioguanina (6-TG). Las dos últimas, 6-MP y 6-TG, se utilizan en el tratamiento de leucemias, mientras que la AZA no está indicada para leucemias y sí se utiliza en el tratamiento de enfermedades autoinmunes como el síndrome de Crohn, colitis ulcerosa, hepatitis autoinmune o esclerosis múltiple entre otras, y también para evitar rechazos en el transplante de órganos.

- 15 A pesar de la actividad antineoplásica de 6-MP y 6-TG no se han utilizado en el tratamiento de tumores sólidos de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado, debido entre otros factores a la resistencia de dichos tumores a la quimioterapia.

- La transformación de la AZA en 6-MP se lleva a cabo por un mecanismo dependiente de glutatión (GSH), en el que participa un grupo de enzimas muy heterogéneo desde el punto de vista molecular, pero que tienen todas ellas en común la capacidad de incorporar al sustrato un resto de glutatión; por ello se denominan glutatión-S-transferasas (GSTs). Las isoformas más activas de las GSTs implicadas en la biotransformación de la AZA son muy abundantes en el hígado y en el colon humano y se inducen en el proceso tumoral (Ruzza P et al. "Glutathione transferases as targets for cancer therapy". *Anticancer Agents Med Chem.* 2009, Vol. 9 (7), pág 763-777). En el cáncer de mama se ha observado que la actividad de las enzimas GSTs está relacionada con la agresividad del cáncer, con la evolución de la enfermedad, y con la respuesta al tratamiento (Bugano DD et al. "Genetic polymorphisms, the metabolism of estrogens and breast cancer: a review". *Eur J Gynaecol Oncol.* 2008, Vol. 29 (4), pág 313-320). Por ello se han desarrollado diferentes métodos para identificar polimorfismos de la familia de las GSTs, su relación con el desarrollo de la enfermedad y con la eficacia del tratamiento (EP 1999278 A2). Asimismo, se han desarrollado inhibidores de las GSTs que permiten evitar la resistencia a agentes quimio-terapéuticos para tratar el cáncer (EP 1865942 A2).
- 20
- 25
- 30

- Las GSTs son enzimas bisustrato que reconocen a la AZA y al glutatión (GSH) y transfieren el GSH al anillo imidazolico de la AZA, liberando 6-MP. Como continuación del proceso, la 6-MP se incorpora al conjunto de nucleótidos gracias a la enzima hipoxantina guanosa fosforribosil transferasa (HGPRT) dando lugar a tioguanosin monofosfato (6-TIMP), el cual tras dos etapas enzimáticas, da lugar a 6-tioguanosin monofosfato (6-TGMP). Dicho nucleótido es inactivo al estar defosforilado, por lo que tras dos etapas de fosforilación se obtiene 6-tioguanosin trifosfato (6-TGTP) nucleótido activo capaz de inhibir rac (proteína G pequeña) dando lugar a la apoptosis del linfocito T activado por CD28. (Tiede I et al. "CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes". *J Clin Invest.* 2003, Vol. 111(8), pág. 1133-1145). Es por lo tanto la molécula de 6-TGTP la que presenta la capacidad de bloquear el proceso patológico en las enfermedades autoinmunes.
- 35
- 40

Por otro lado, el nucleótido 6-TGMP (6-tioguanosin monofosfato) formado en la anterior ruta metabólica puede ser transformado por la ribonucleótido reductasa (RR) en desoxi-6-TGMP, que da lugar al nucleótido desoxi-6-TGTP tras dos etapas de fosforilación.

- Los nucleótidos 6-TGTP y desoxi-6-TGTP se pueden incorporar al ARN y al ADN respectivamente de las células que se están dividiendo activamente, como por ejemplo de los linfoblastos de los pacientes con leucemia (Coulthard SA et al. "The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs". *Mol Pharmacol.* 2002, Vol. 2(1), pág 102-109). Como consecuencia se forma ARN mensajero y ADN aberrante que dan lugar a mutaciones puntuales y a aberraciones cromosómicas que conducen a la muerte celular por mecanismos dependientes de p53 y del sistema de reparación de ADN conocido como MMR (mismatch repair system) (Zeng X et al. "DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells". *Clin Cancer Res.* 2007, Vol. 13(4), pág. 1315-1321). Esta última vía es la responsable de los efectos terapéuticos en el tratamiento de la leucemia, pero también de efectos adversos graves como la mielotoxicidad en pacientes con enfermedades autoinmunes tratados con tiopurinas (Gisbert JP et al. "Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients". *Am J Gastroenterol.* 2006, Vol. 101(12), pág. 2769-2776) o con otras patologías. El número de leucocitos circulantes depende de la
- 45
- 50
- 55

rápida proliferación de sus precursores celulares en la médula ósea, por lo que un aumento exagerado de 6-TGTP y de desoxi-6-TGTP pueden dar lugar a citotoxicidad de los precursores medulares y por lo tanto a mielotoxicidad. La aparición de dicho efecto adverso se ha relacionado con los niveles de tiopurin metiltransferasa (TPMT), enzima que incorpora grupos metilo sobre la el azufre de las tiopurinas y por lo tanto da lugar a moléculas con menor actividad farmacológica. La disminución de la actividad de la TPMT aumenta la probabilidad de padecer mielotoxicidad al ser tratado con AZA (Gisbert JP et al. "Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients". Am J Gastroenterol. 2006, Vol. 101(12), pág. 2769-2776).

Además existe un porcentaje de pacientes (3-5%) que presentan hepatotoxicidad al ser tratados con AZA, lo que se ha relacionado con la reducción de los niveles de glutatión (GSH). Estos datos se han confirmado en estudios llevados a cabo in vitro utilizando hepatocitos normales de rata en cultivo, cuyo tratamiento con AZA da lugar a necrosis, procesos que se revierte con un precursor del glutatión como N-acetilcisteína (Menor C et al. "Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine". J Pharmacol Exp Ther. 2004, vol. 311(2), pág. 668-676). En dicho modelo experimental el BSO, un inhibidor de la síntesis de glutatión, favorece los efectos tóxicos de la AZA sobre los hepatocitos de rata en cultivo (Lee AU et al. "Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury". Journal of hepatology, 2001, Vol. 35(6), pág. 756-764). Esta publicación examina el efecto citotóxico de la combinación de una dosis única de cada compuesto, por lo que es imposible saber si hay un fenómeno de sinergia o tal solo de aditividad. En el estudio se demuestra que una de las líneas tumorales utilizadas son resistentes a los efectos de la AZA; en concreto, las células HepG2 procedentes de un hepatoblastoma humano muestran un comportamiento completamente diferente a los hepatocitos de rata en cultivo, resultando insensibles tanto a la AZA como a la 6-MP (Lee AU et al. "Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury". Journal of hepatology, 2001, Vol. 35(6), pág. 756-764).

Aunque la asociación de AZA y BSO conduce a una mayor toxicidad que la de ambos fármacos por separado en cultivos de hepatocitos normales de rata, resulta imprevisible el efecto de AZA y BSO sobre las células tumorales de hígado y de colon resistentes a la quimioterapia convencional. Para probar dicho efecto los inventores han estudiado el efecto de la combinación de ambas moléculas sobre células tumorales procedentes de hígado, en concreto HepG2, HuH7 y células Chang de hígado (Tsang JY et al. "P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells". Apoptosis 2011, Vol. 16(5), pág 524-535; Hoffmann K et al. "Sorafenib modulates the gene expression of multi-drug resistance mediating ATP-binding cassette proteins in experimental hepatocellular carcinoma". Anticancer Res 2010, Vol. 30(11), pág 4503-4508; Buranrat B et al. "Dicoumarol enhances gemcitabine-induced cytotoxicity in high NQO1-expressing cholangiocarcinoma cells". World J Gastroenterol 2010, Vol. 16(19), pág 2362-2370) y de colon, en concreto RKO, LoVo, SW48 y SW480 ( Lee W et al. "Overexpression of OATP1B3 confers apoptotic resistance in colon cancer". Cancer Res 2008, Vol. 68(24), pág 10315-10323; Zhang YF et al. "CIAPIN1 confers multidrug resistance through up-regulation of MDR-1 and Bcl-L in LoVo/Adr cells and is independent of p53". Oncol Rep 2011, Vol. 25(4), pág 1091-1098; Chai H et al. "miR-20a targets BNIP2 and contributes chemotherapeutic resistance in colorectal adenocarcinoma SW480 and SW620 cell lines". Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2011, Vol. 43(3), pág 217-225). Todas ellas tienen en común que son resistentes a multitud de fármacos anticancerosos.

La resistencia se debe a múltiples factores, muchos de ellos desconocidos, entre los que se cuentan el aumento en la expresión de las isoformas de la glutatión-S-transferasa, de los niveles de glutatión en el interior del tumor o de los niveles de la glicoproteína P (Abd El-Moneim E et al. "Gene deletion of glutathione-S-transferase M1 and T1 and risk factors of hepatocellular carcinoma in Egyptian patients". Egypt J Immunol, 2008, Vol. 15(2), pág 125-134); todo ello hace que sea imprevisible el efecto de la quimioterapia en los modelos experimentales de cáncer de hígado y de colon.

A estas características moleculares se debe la resistencia a la quimioterapia del hepatoblastoma, del hepatocarcinoma, del cáncer de colon y de las metástasis del cáncer de colon en el hígado humano. Es conocido en la técnica que la elevación intracelular del glutatión se ha asociado con resistencia a la irradiación y a la quimioterapia, y por ello se ha utilizado BSO para sensibilizar los tumores al óxido arsenioso, a la doxorubicina y al melfalan (WO 02/060460). Algunos de estos estudios están en fase clínica.

Kirkpatrick DL describe una disminución de la supervivencia celular de las células EMT6, una línea celular murina de cáncer de mama, con el uso combinado de BSO y purinas disulfuradas en posición 6, en lo que supone la publicación más cercana de la técnica (Kirkpatrick DL. "Modification of antitumor disulfide cytotoxicity by glutathione depletion in murine cells". Cancer research, 1987, Vol. 47(16), pág 4391-4395). Sin embargo las moléculas descritas en dicho trabajo son muy diferentes a la AZA, porque presentan un enlace disulfuro para unir la purina con los diferentes derivados aromáticos y alifáticos, mientras que la AZA tiene un puente tiólico para unir la purina con el anillo imidazólico. Las diferencias estructurales entre dichos compuestos y la AZA, dará lugar a una biotransformación diferente mediante las correspondientes enzimas metabolizadoras y por lo tanto a diferentes compuestos terapéuticos.



Los resultados anteriores no ofrecen ninguna garantía de que la combinación de la AZA y del BSO vaya a resultar eficaz en el tratamiento de células tumorales de hígado y de colon.

5 Existen en la técnica muchos otros principios activos susceptibles de ser probados en combinación con BSO para el tratamiento de tumores sólidos de hígado y colon con mejores expectativas que las tiopurinas, como por ejemplo la combinación de BSO con quinonas (Chew EH et al. Antitumor quinols: role of glutathione in modulating quinol-induced apoptosis and identification of putative cellular proteins targets. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, Vol. 346(1), pág 242-251), taxoles (Hadzic T et al. Paclitaxel combined with inhibitors of glucose and hydroperoxide metabolism enhances breast cancer cell killing via H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine, 2010, Vol. 48(8), pág 1024-1033), compuestos de platino (Benedetti DT et al. Effects of Noncovalent Platinum Drug-Protein Interactions on Drug Efficacy: Use of Fluorescent Conjugates as Probes for Drug Metabolism. Molecular Pharmaceutics, 2011, Vol. 6(8), pág. 940-948). Estas combinaciones preferentes resultarían en un trabajo preclínico inabordable, y por tanto no sugieren el descubrimiento sorprendente de la combinación de la presente invención.

15 El efecto terapéutico "in vivo" de una combinación de dos fármacos depende, entre otros factores, de la vía de administración y de la biodisponibilidad de ambos fármacos. Los niveles de GSH/GST del paciente en los efectos de ambos medicamentos también son de gran importancia.

20 Aunque existen pocos datos sobre la farmacocinética del BSO, todo hace suponer que es bastante diferente a la de la AZA debido a sus características químicas. La AZA es una molécula hidrofóbica cuya biodisponibilidad por vía oral en la especie humana es del 47% y un  $t_{1/2}=1.1$ h valorados a partir de los niveles alcanzados en sangre de 6-MP. El BSO es una molécula hidrofílica que se administra como un racémico, con el isómero L-butionina-[S,R]-sulfoximina como forma activa, con una farmacocinética en la especie humana muy compleja que se ajusta a un modelo lineal de dos compartimentos para el que no existen datos en la bibliografía sobre biodisponibilidad.

25 Por todo ello, durante el tratamiento con ambas moléculas resulta imposible predecir su comportamiento simultáneo (AZA y BSO) sobre las células tumorales, su efecto farmacológico o terapéutico sobre dichas células tumorales, la existencia de sinergia, aditividad o antagonismo entre ambos medicamentos y la ausencia de efectos tóxicos sobre las células sanas del hígado, riñón, músculo y de otros órganos.

30 El problema que se plantea en la técnica, por tanto, es encontrar fármacos alternativos eficientes en el tratamiento de tumores refractarios a los distintos agentes activos de quimioterapia, en particular cánceres de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado. La solución propuesta por la presente invención es la terapia combinada de AZA y BSO para el tratamiento de este tipo de tumores resistentes.

### **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

Los inventores han descubierto que la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO) sensibiliza las células tumorales al tratamiento con azatioprina (AZA).

35 Una primera realización de la presente invención es el uso de una combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario.

En el la presente solicitud se entiende por "tumor refractario" a tumores resistentes al tratamiento quimioterápico utilizado en primera línea.

40 En la presente invención se entiende que el término "combinación" refiere a una administración de los compuestos de la invención simultánea, secuencial o por separado. En una realización de la invención, "combinación" refiere a la administración simultánea. En otra realización, "combinación" refiere a la administración secuencial. En otra realización más de la invención, "combinación" refiere a la administración por separado. En las realizaciones de administración secuencial o por separado, el retraso en la administración del segundo componente deberá ser tal que ambos compuestos lleguen a estar presentes en el cuerpo del paciente de forma que sean capaces de actuar conjuntamente.

45 El cáncer de hígado, así como las metástasis del cáncer de colon en el hígado, es refractario a la quimioterapia sistémica siendo la resección o el trasplante el único tratamiento curativo. Para aquellos tumores irresecables el tratamiento paliativo es la quimioembolización transarterial (TACE), mediante la cual se induce necrosis tumoral por infusión a través de la arteria hepática de lipíol y/o de partículas de gelatina junto con ciertos agentes quimioterapéuticos, p.ej. cisplatino. Esta estrategia se conoce como tratamiento locorregional del tumor localizado en el hígado, y ensayos clínicos realizados recientemente han demostrado su eficacia. Para mejorar la eficacia de este tratamiento esperanzador se necesitan nuevos fármacos que actúen por un mecanismo diferente al ya probado para buscar nuevas asociaciones beneficiosas. La combinación de AZA y BSO de la presente invención va a tener especial utilidad en el tratamiento del tumor localizado en el hígado tanto primario como metastático.

- 5 De forma que en otra realización de la invención dicho tumor refractario es un cáncer. En una realización preferible dicho cáncer es un blastoma, más preferiblemente un hepatoblastoma. En otra realización preferible dicho cáncer es un carcinoma, más preferiblemente un carcinoma hepático o un carcinoma de colon. En otra realización preferible más, dicho cáncer es una metástasis de un carcinoma de colon, y en otra más dicho cáncer es una metástasis de un cáncer primario de hígado.
- Debido a que en el tratamiento contra el cáncer se suele usar terapia múltiple, otra realización de la invención es el uso de una combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno.
- 10 La presente invención también contempla el suministro al profesional médico de cada uno de los componentes por separado. Así, una realización más es el uso de AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con BSO o sus sales farmacéuticamente aceptables. O bien, el uso de BSO o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 15 Expresado de otra forma, la presente invención es la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de un tumor refractario, preferiblemente un cáncer, más preferiblemente un blastoma y aún más preferiblemente un hepatoblastoma. Otra realización preferible es que dicho cáncer sea un carcinoma, más preferiblemente un carcinoma hepático o un carcinoma de colon. Y otra realización preferible es que dicho cáncer sea una metástasis de un carcinoma de colon o una metástasis de un cáncer primario de hígado. Resulta interesante utilizar la combinación de la invención en terapia combinada, de forma que una realización más es la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno. Otra realización más es AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento contra un tumor refractario en terapia combinada con BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables; o bien BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario en terapia combinada con AZA o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 20 No resulta obvio que el profármaco AZA junto con BSO sea eficaz en las células tumorales y no lo sean los antineoplásicos 6-TG y 6-MP con BSO. De acuerdo a las enseñanzas de la técnica debería ser al contrario. Tampoco es obvio que la asociación sea eficaz *in vivo* sobre el hepatoblastoma sin efectos adversos de consideración sobre el hígado, corazón y músculo del ratón. Este resultado depende entre otros factores de la farmacocinética, de la que hay pocos resultados sobre todo respecto a BSO, pero también de la AZA como fármaco activo ya que sólo se miden los niveles de su producto derivado en sangre, la 6-MP.
- 25 Una realización muy preferible de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables. Esta composición puede comprender diversas formulaciones galénicas con distintos excipientes como atadores, rellenos, lubricantes, recubridores; partículas de hidrogel biodegradable hidrofóbico e hidrofílico, emulsiones lipídicas, micelas, liposomas, polímeros dendríticos, nanocápsulas, nanoesferas, nanopartículas de oro coloidal o cristal líquido.
- 30 Otra realización más preferible aún es dicha composición farmacéutica para el tratamiento de un tumor refractario en un sujeto, preferiblemente administrado en el tracto gastrointestinal, o bien por vía endovenosa o por vía peritumoral. La composición farmacéutica de la invención es preferiblemente una emulsión y más preferiblemente una efusión grasa. El sujeto al que se le administra la invención es preferiblemente un mamífero, más preferiblemente un paciente humano.
- 35 Una realización más es la composición farmacéutica de la invención en que la administración de AZA y BSO se realiza de forma simultánea. Otra realización es que la administración de AZA y BSO se realice de forma separada o secuencial.
- 40 La realización más preferible de la invención es un método de tratamiento de un tumor refractario en un mamífero, preferiblemente humano, que comprende administrar a dicho mamífero afectado por la enfermedad una cantidad terapéuticamente efectiva de la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables. Y otra realización más es un método de tratamiento de un tumor refractario, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprenda la combinación de AZA y BSO, o sus sales farmacéuticamente aceptables, a un sujeto preferiblemente humano en necesidad de ella.
- 45 Una realización muy preferible de la invención es un kit que incluye contenedores separados que contienen al menos dos formulaciones farmacéuticas que comprenden AZA y BSO conjuntamente o por separado, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables e instrucciones para el uso de uno de esos componentes en conjunción

con el otro componente. O bien un kit que comprende AZA y BSO aptos para su administración simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un tumor gastrointestinal en un sujeto, preferiblemente un paciente humano.

5 A diferencia de los experimentos "in vitro", en los modelos "in vivo" los efectos de AZA y BSO dependen de la liberación, absorción, permeabilidad, transporte, distribución, activación/ desactivación metabólica y excreción (LADME) de ambos agentes activos, parámetros que no resultan predecibles para ningún fármaco. Por ello, los efectos sinérgicos encontrados para la combinación de la invención han resultado tan sorprendentes.

10 La inducción de tumores por la implantación subcutánea de células procedentes de un hepatoblastoma HepG2 en ratones atímicos, que es el modelo experimental utilizado en la presente invención, es un modelo clásico para el estudio del efecto de la quimioterapia administrada localmente sobre el crecimiento tumoral.

Las propiedades farmacológicas de la asociación de AZA y BSO en el tratamiento de los tumores de hígado y tracto gastrointestinal se muestran en los resultados de los ejemplos aportados en la presente solicitud.

15 La sinergia terapéutica de la combinación AZA y BSO queda documentada en el Ejemplo 1. La AZA más el BSO indujeron en las células HepG2 muerte celular, mientras que AZA o BSO separadamente en las mismas concentraciones fueron ineficaces de llevar a cabo tal efecto. Se observaron efectos significativos a partir de 125  $\mu\text{M}$  de AZA y 500  $\mu\text{M}$  de BSO. Los resultados demuestran que el tratamiento con BSO potencia los efectos de AZA en estas células aumentando la eficacia en 6,8 veces con respecto a la AZA en solitario. La concentración efectiva del 50% ( $\text{CE}_{50\%}$ ) de AZA en ausencia de BSO fue de 781  $\mu\text{M}$ , mientras que la  $\text{CE}_{50\%}$  de AZA en presencia de BSO fue de 115  $\mu\text{M}$ . Esta última concentración es entre 8,9 y 17,9 veces menor que los niveles plasmáticos de AZA alcanzados en el tratamiento de enfermos de Crohn mediante una dosis de carga de 20 o de 40 mg de AZA/ Kg de peso del paciente (Mahadevan U et al. "Intravenous azathioprine in severe ulcerative colitis: a pilot study". Am J Gastroenterol, 2000, Vol. 95(12), pág 3463-3468), lo que indica que la concentración de AZA necesaria para destruir las células cancerosas sensibilizadas con BSO es compatible con las concentraciones del fármaco alcanzadas en el tratamiento de otras enfermedades. El estudio de Mahadevan et al. nos permite definir el límite superior de la ventana terapéutica en la especie humana. En dicho ensayo clínico se administró azatioprina, cuyo peso molecular es de 277,26 gr/mol, a dos dosis de 20 o 40 mg/kg peso por vía intravenosa, lo que supone unas concentraciones circulantes de AZA en el momento de la infusión de entre 1030  $\mu\text{M}$  y 2060  $\mu\text{M}$ , considerando un volumen de sangre de 4,9 litros. En dicho estudio se observó que los efectos adversos en el tratamiento con AZA a dosis de carga o tratamiento agudo fueron ligeramente superiores a los observados en la administración oral o tratamiento crónico, en el se utilizan menores dosis de AZA (1,5-3,0 mg/kg de peso) durante períodos largos de tiempo. Por lo tanto, comparando la concentración necesaria de AZA para destruir el 50% de las células tumorales sensibilizadas con BSO ( $\text{CE}_{50\%} = 115 \mu\text{M}$ ), con la concentración del fármaco (1030-2060  $\mu\text{M}$ ) alcanzado en sangre en el estudio de Mahadevan et al., se puede concluir que la combinación de AZA mas BSO debe ser eficaz en el tratamiento de tumores quimioresistentes sin incrementar dramáticamente los efectos adversos. Extrapolando estos resultados al tratamiento de tumores quimioresistentes en la especie humana, se puede decir que se alcanzaría la ventana terapéutica para AZA a las dosis que ya se utilizan en el tratamiento agudo de la enfermedad de Crohn, a condición de que se sensibilizaran con BSO.

40 La selectividad del efecto del tratamiento en diferentes tipos de células tumorales se representa en el los resultados del Ejemplo 2, que muestra la eficacia terapéutica de AZA y del BSO en todas las células tumorales utilizadas de procedencia gastrointestinal de colon e hígado que demostraron previamente ser resistentes a múltiples fármacos, lo cual demuestra que puede ser útil en el tratamiento de cáncer de hígado, de colon y de las metástasis del cáncer de colon en el hígado.

45 La especificidad farmacológica de la azatioprina frente a otras tiopurinas se detalla en el Ejemplo 3, que muestra que el efecto terapéutico se debe al profármaco AZA y en mucha menor medida a los metabolitos subsiguientes: 6-mercaptopurina y 6-tioguanina, considerados activos, o 6-metiltioguanina y 6-metilmercaptopurina, considerados inactivos. Los resultados indican que la asociación AZA y BSO puede ser eficaz porque actúa por un mecanismo diferente al resto de las tiopurinas, probablemente porque interfiere con el sistema GSH/Glutation-S-Transferasa necesario en la transformación de la AZA y no en la transformación del resto de las tiopurinas estudiadas. El resultado de la acción de la AZA en combinación con BSO sería la inducción de un proceso de muerte celular dependiente de GSH/GST que podría ser crítico en tratamiento de tumores del tracto gastrointestinal referidos previamente. En el momento actual no se conoce ningún fármaco de uso clínico para el tratamiento del tumores quimioresistentes que actúe sobre dicha diana terapéutica.

55 El mecanismo molecular implicado en el proceso terapéutico o señalización se muestra en los resultados del Ejemplo 4, que destacan la importancia del estrés oxidativo y las quinasas activadas por estrés (JNK y p38) en la inducción de la muerte de las células HepG2. Previamente, se ha descrito en la técnica que la activación de JNK provoca un incremento de la proteína bax o una translocación de bax a la mitocondria. Los inventores han observado también un incremento de bax después del tratamiento de AZA más BSO sin cambios en las proteínas de bcl-2, bad o bid (Figura 9).

El resultado del Ejemplo 5 muestra que el tratamiento combinado de BSO y AZA produce la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial. Esto predispone a la célula al desarrollo de una muerte celular programada.

Respecto a los efectos terapéuticos *in vivo*, el resultado del Ejemplo 6 muestra cómo los resultados obtenidos *in vitro* son extrapolables a un modelo de xenoinjerto de HepG2 en ratones atímicos. El tratamiento combinado con AZA y BSO por vía peritumoral produjo una reducción significativa del volumen del tumor con respecto a los otros tres grupos estudiados, DMSO, AZA o BSO. El tratamiento combinado de AZA y BSO no produjo cambios significativos en los niveles de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatina quinasa (CK) con respecto al grupo tratado con AZA solamente. Esto indica que la toxicidad de la combinación de ambos medicamentos no tiene mayor toxicidad sistémica en hígado, corazón, músculo o riñón que la correspondiente a la observada para la AZA. Las dosis usadas en este estudio preclínico en ratones son muy similares a las utilizadas en el tratamiento con AZA por vía oral de pacientes con enfermedades autoinmunes y en los ensayos clínicos con BSO que se están llevando a cabo. Las dosis utilizadas de AZA, 6 mg/kg peso, en el presente estudio son menores que las usadas para dicha molécula en la especie humana cuando se administra por vía endovenosa para colitis ulcerosa, de hasta 40 mg/kg peso.

### 15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **figura 1** muestra la viabilidad celular de las células HepG2 con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de AZA. Las concentraciones de AZA son las siguientes: 0  $\mu$ M (DMSO) ( $\square$ ), 75  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), 150  $\mu$ M ( $\blacktriangledown$ ), 300  $\mu$ M ( $\blacklozenge$ ), 600  $\mu$ M ( $\bullet$ ), 1000  $\mu$ M ( $\square$ ). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.001$  (\*\*\*)

20 La **figura 2** muestra la actividad metabólica de las células HepG2 con respecto al tiempo a diferentes concentraciones de AZA. Las concentraciones de AZA son las siguientes: 0  $\mu$ M (DMSO) ( $\square$ ), 75  $\mu$ M ( $\blacktriangle$ ), 150  $\mu$ M ( $\blacktriangledown$ ), 300  $\mu$ M ( $\blacklozenge$ ), 600  $\mu$ M ( $\bullet$ ), 1000  $\mu$ M ( $\square$ ). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

25 La **figura 3** muestra la actividad metabólica de las células HepG2 tratadas previamente con BSO para diferentes concentraciones de AZA. Los signos de los tratamientos son los siguientes: AZA ( $\circ$ ), BSO (500  $\mu$ M) + AZA ( $\bullet$ ). Las diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, se indican con los siguientes signos:  $P < 0.001$  (\*\*\*)

30 La **figura 4** muestra la sensibilización de las células HepG2 con respecto al tiempo a una concentración de AZA tratadas previamente con BSO. Los signos de los tratamientos son los siguientes: AZA (150  $\mu$ M) ( $\circ$ ), BSO (500  $\mu$ M) + AZA (150  $\mu$ M) ( $\bullet$ ). Las diferencias estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

35 La **figura 5** muestra el efecto sobre el nivel intracelular de GSH, de BSO (500  $\mu$ M) + AZA (300  $\mu$ M), y de AZA (300  $\mu$ M), según el tiempo de tratamiento con AZA. Las diferencias estadísticamente significativas se comparan con respecto a su control de cada serie (0h de tratamiento con AZA). Se indican con los siguientes signos:  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

El efecto del BSO (500  $\mu$ M) se compara con respecto a su control a 0h de tratamiento con AZA ( $\ddagger$ ,  $P < 0.001$ )

La **figura 6** muestra la sensibilización de las células de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang Liver) y de las células de cáncer de colon (LoVo, SW-480, RKO y SW-48) al tratamiento con BSO + AZA. Las diferencias con respecto al control (DMSO + BSO) que alcanzaron la significatividad estadística se indican con los siguientes signos:  $P < 0.001$  (\*\*\*)

40 La **figura 7** muestra la actividad metabólica de las células HepG2 tratadas con DMSO, BSO, AZA y con sus metabolitos secundarios 6-mercaptopurina (6-MP), 6-metilmercaptopurina (6-MMP), 6-tioguanina (6-TG) y 6-metiltioguanina (6-MTG). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (DMSO + BSO) se indican con los siguientes signos:  $P < 0.05$  (\*),  $P < 0.01$  (\*\*),  $P < 0.001$  (\*\*\*)

45 La **figura 8** muestra la importancia de las quinasas activadas por estrés, JNK y p38, en la inducción de la muerte celular de HepG2. La combinación BSO + AZA produce la activación de las rutas de señalización de las quinasas del estrés activando su fosforilación (JNK y P38). Esta activación se bloquea con los inhibidores de las propias quinasas (SP=SP600125, SB=SB203580) o con el precursor de la síntesis de GSH, N-acetilcisteína (NAC).

La **figura 9** muestra la variación en los niveles de las proteínas Bax, Bad, Bid, Bcl-2 y  $\beta$ -tubulina después del tratamiento a diferentes tiempos con la combinación BSO (500  $\mu$ M + AZA (300  $\mu$ M).

50 La **figura 10** muestra la reducción del volumen del tumor a lo largo de los días de tratamiento con distintos fármacos: DMSO ( $\blacksquare$ ), BSO ( $\blacktriangledown$ ), AZA ( $\blacktriangle$ ), BSO + AZA ( $\bullet$ ) a las dosis indicadas en el texto. Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.05$  (\*).

La figura 11 muestra la reducción del tumor en dos ratones atímicos a los que se les implantaron  $10^7$  células HepG2. El de la izquierda fue tratado con 0.1 ml DMSO (5%) y el de la derecha fue tratado con BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día).

5 La figura 12 muestra los niveles de GSH en los tumores en el momento del sacrificio (12 días) cuando los animales fueron tratados con 0.1 ml DMSO (5%), BSO (90 mg/kg/día), AZA (6 mg/kg/día) o BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día). Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.01$  (\*\*).

La figura 13 muestra la actividad enzimática de la enzima ALT (alanina transaminasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12.

10 La figura 14 muestra la actividad enzimática del enzima AST (aspartato transaminasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12. Las diferencias con respecto al control (DMSO) estadísticamente significativas se indican con los siguientes signos:  $P < 0.01$  (\*\*).

La figura 15 muestra la actividad enzimática de la CK (creatina quinasa) plasmática de los animales tratados con DMSO, BSO, AZA o BSO + AZA en las condiciones de la figura 12.

## 15 **EJEMPLOS**

Con la intención de mostrar la presente invención de un modo ilustrativo aunque en ningún modo limitante, se aportan los siguientes ejemplos.

### **Metodología General**

20 La azatioprina (AZA) fue cedida por Celltech Pharma S.A. (Madrid, España). El MEM, el suero bovino fetal y la solución antibiótica/antimicótica se adquirieron de GIBCO (Madrid, España). Los anticuerpos contra fosfo-p54/46 JNK (quinasa N-terminal c-jun), p-p38, JNK, p38 y  $\beta$ -tubulina eran de Cell Signalling Technology Inc. (Beberly, Massachusetts) y los anticuerpos contra Bax, Bid, Bad, Bcl-2, citocromo c, caspasa 3, GCS, PARP eran de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA). El inhibidor de p-38 (SB203580, 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol), el inhibidor de JNK (SP600125, 1,9-pirazoloantrona), la IgG anti-conejo y anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante eran de Calbiochem (Barcelona, España). El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT), la L-butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), la 6-mercaptopurina (6-MP) y la 6-metilmercaptopurina (6-MMP) eran de Sigma Chemical Co. (Madrid, España). La 2-amino-6-mercaptopurina (6-TG) y la 2-amino-6-metilmercaptopurina eran de ICN Biomedicals Inc. (Ohio, USA.). El inhibidor de caspasa 3, Z-VAD-mfk, era de Bachem. Ac-DEVD-AMC era de Alexis biochemicals. OxyBlotTMProtein Oxidation Kit era de Millipore. Los reactivos de detección del Western blot, ECL, e Hyperfilm fueron proporcionados por Amersham Pharmacia Biotech (Buckinghamshire, Reino Unido) y la acrilamida/bisacrilamida de Bio-Rad Laboratories (Hércules, CA). Todos los reactivos eran del grado más alto de pureza disponible en el mercado.

Los animales utilizados para llevar a cabo los experimentos *in vivo* fueron ratones desnudos atímicos del tipo Athymic Nude-Foxn1 nu de Harlan Laboratories (Indianapolis, IN).

### 35 **Ejemplo 1: Resistencia de las células tumorales a la Azatioprina y su sensibilización por BSO.**

Células de las líneas HepG2, HuH7 y Chang (Sigma Chemical Co.) se hicieron crecer en MEM suplementado con suero bovino fetal al 10% y solución antibiótica/ antimicótica al 1% y se mantuvieron en una incubadora a 37°C humidificada con CO<sub>2</sub> al 5%. Para comprobar la resistencia de las células HepG2, se estudió la viabilidad celular y la actividad metabólica frente a AZA a distintas dosis. La actividad metabólica se analizó mediante un ensayo de reducción de MTT tal como se ha descrito previamente (Alley et al. "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay". Cancer Res, 1988, Vol. 48(3), pág. 589-601), con ligeras modificaciones. Estas modificaciones consistieron en que después de la incubación con AZA se añadió al cultivo celular solución de reserva de MTT en PBS, para obtener una concentración final de 0,5 mg/ml de MTT en el medio. Las células fueron incubadas durante 3 h más a 37°C. Se disolvieron cristales de formazán en HCl 0,1M en isopropanol y la absorbancia se midió usando un lector de microplacas a una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 650 nm. La viabilidad celular se determinó mediante el ensayo de exclusión de azul tripano según lo descrito por Shin et al. (Shin KJ et al. "2,2',4,6,6'-pentachlorobiphenyl induce apoptosis in human monocytic cells". Toxicol Appl Pharmacol, 2000, Vol. 169(1), pág. 1-7). Los resultados mostraron que las células HepG2 eran muy resistentes a las diferentes dosis de AZA (figuras 1 y 2). A continuación se realizaron ensayos para comprobar la sensibilización de las células a la AZA por tratamiento con BSO. Para ello, células HepG2 fueron tratadas previamente con BSO (500  $\mu$ M durante 24 h). Los datos mostraron que el BSO sensibilizaron las células HepG2 a la AZA (figura 3) y que la sensibilización de la célula HepG2 mediante pretratamiento con BSO (500  $\mu$ M) fue significativa desde 6 h de tratamiento con AZA (figura 4). Por otro lado, se comprobó el efecto de BSO (500  $\mu$ M) y AZA (300  $\mu$ M) sobre los niveles intracelulares de GSH (figura 5). Los niveles intracelulares de GSH se determinaron fluorimétricamente según lo descrito por Hissin y Hilf (Hissin PJ et al. "A fluorometric method for

determination of oxidized and reduced glutathione in tissues". Anal Biochem, 1976, Vol. 74(1), pág. 214-26), con ligeras modificaciones. Estas modificaciones consistieron en que, después del tratamiento, el homogenizado celular obtenido en tampón de fosfato sódico 0,1 M-EDTA 5 mM (pH 8) se trató con perclorato potásico al 14% para precipitar las proteínas. Después de centrifugar, el GSH se estimó verificando la intensidad de fluorescencia de los aductos de OPT-glutation a 420 nm con la longitud de onda de excitación a 350 nm. Como resultado de este ensayo se comprobó que las células HepG2 fueron sensibles al tratamiento con BSO (500  $\mu$ M) más AZA (300  $\mu$ M) ya que se redujeron los niveles de GSH en las células (figura 5). También se comprobó que diferentes líneas celulares, tanto de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang) como de cáncer de colon (LoVo, SW-480, RKO y SW-48) fueron sensibles al tratamiento con BSO (500  $\mu$ M) más AZA (300  $\mu$ M) ya que se redujo en ellas significativamente la actividad metabólica con respecto al vehículo (DMSO) (figura 6).

### **Ejemplo 2: Especificidad de la Azatioprina.**

Para comprobar que el efecto farmacológico observado del Ejemplo 1 es específico de AZA y no de sus metabolitos secundarios, se realizaron los mismos experimentos anteriores con dichos metabolitos (6-mercaptopurina, 6-metilmercaptopurina, 6-tioguanina y 6-metiltioguanina) en combinación con BSO. El resultado mostró que todos ellos sólo producían un pequeño efecto sobre la muerte de células HepG2 (figura 7).

### **Ejemplo 3: Inducción de la muerte celular programada de las células HepG2 por AZA + BSO.**

Las proteínas se extrajeron de las células HepG2 usando un tampón de Tris (50 mM), pH 8, que contenía NaCl (150 mM), EDTA (5 mM), EGTA (1 mM), PMSF (0.1 mM), ortovanadato (1 mM), NaF (30 mM), leupeptina (2  $\mu$ g/ml), aprotinina (10  $\mu$ g/ml), DTT (1 mM) y triton x-100 (1%). La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Bradford MM. "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding". Anal Biochem., 1976, Vol. 7(72), pág 248-254). Las proteínas se incubaron con tampón de carga durante 5 minutos a 95°C y se cargaron sobre gel de SDS-PAGE para llevar a cabo la electroforesis y después se transfirieron a membranas de nitrocelulosa durante la noche a 25 V y 4°C. Las membranas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5% en TBS-Tween. Las inmunotransferencias se revelaron usando anticuerpos específicos contra pJNK, p-p38, JNK, p38, Bax, Bid, Bad, Bcl-2. Los anticuerpos secundarios usados fueron IgG anti-conejo y anti-ratón conjugada a peroxidasa de rábano picante. Se usaron potenciadores de la quimioluminiscencia de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y las membranas resultantes se expusieron a Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences). La AZA (300  $\mu$ M) o la BSO (500  $\mu$ M) solas fueron incapaces de activar JNK1/2 mientras que en combinación produjeron un incremento drástico de la fosforilación de JNK1/2 que fue inhibida por el inhibidor de JNK SP600125 (Figura 8). La activación de JNK1/2 se tradujo en la translocación de bax a la mitocondria sin cambios en Bad, Bid o Bcl-2 lo que involucra a la mitocondria en la muerte celular inducida por AZA + BSO (figura 9).

### **Ejemplo 4: Integridad de la membrana mitocondrial**

La integridad de la membrana mitocondrial se estimó usando una sonda JC-1 (yoduro/cloruro de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbencimidazolilcarbocianina) basada en un método de detección del potencial de membrana mediante citometría de flujo ( $\Delta\Psi$ ) (mito-screen, Becton Dickinson, BD Bioscience, San José, California). Este método se basa en la pérdida de potencial de la membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) como una señal de la muerte celular. Esta sonda se usa para medir cambios de potencial de la membrana mitocondrial en células: En las células viables, JC-1 se acumula como agregados en la mitocondria, dando como resultado fluorescencia roja (570 nm). El brillo de la fluorescencia roja es proporcional a  $\Delta\Psi$  y varía entre diferentes tipos. Sin embargo, en células con la mitocondria dañada, JC-1 existe en forma de monómero y tiñe las células de verde (530 nm).  $1 \times 10^6$  células/0,5 ml se incubaron con JC-1 durante 10 minutos a 37°C en el incubador con CO<sub>2</sub>. Después del lavado, el análisis de las muestras se realizó usando un citómetro FacsAria (Becton Dickinson, San Jose, CA). Este citómetro está equipado con tres láseres a las siguientes longitudes de onda: 488, 633 y 405 nm. Se usó un láser de 488 nm. Se usaron detectores de las áreas de FWS frente a SSC y FITC frente a PE. El área de SSC frente a SSC se usó para excluir dobletes en la muestra. El análisis de los datos se realizó con software FacsDiva y se obtuvieron, en resumen, los siguientes resultados (células con membrana mitocondrial intacta: DMSO=85%, BSO (500  $\mu$ M) + AZA (300  $\mu$ M) =2%). Estos resultados confirman la participación de la mitocondria en la muerte celular programada inducida por la combinación de AZA plus BSO.

### **Ejemplo 5: Análisis de la actividad de caspasa-3**

Después de los tratamientos con BSO (500  $\mu$ M) y con BSO (500  $\mu$ M) + AZA (300  $\mu$ M); las células HepG2 se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se sometieron a lisis añadiendo tampón de lisis a 4°C que contenía Tris-HCl 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/NaHPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,5, NaCl 130 mM, Triton-X-100 al 1%, NaPPi (pirofosfato sódico) 10 mM. El extracto se centrifugó a 20.000 g durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se recogió y se almacenó a -20°C. El lisado celular se incubó durante 60 min a 37°C en un tampón que contenía HEPES 20 mM (pH 7,5), glicerol al 10%, DTT 2 mM que contenía el sustrato fluorescente específico de la caspasa-3 (Ac-DEVD-AMC) (Alexis Biochemicals). La escisión del sustrato de caspasa-3 se verificó usando un lector de fluorescencia de placas a longitudes de onda de excitación/emisión de 355/460 nm. Se obtuvieron los resultados siguientes, en porcentaje: BSO(500  $\mu$ M) =

100,00±6,62, BSO (500 µM) + AZA (300 µM)= 92,79±6,09. Y como control positivo de actividad caspasa-3, se incubaron las células HepG2 con TNF-α (35 pM)+ Actinomicina D (0,8 µM) obteniendo un resultado de 143.00±5.77 (P<0.05) con respecto al control en presencia de BSO (500 µM). Por lo tanto, el tratamiento combinado BSO (500 µM) + AZA (300 µM) no activó la caspasa-3

#### 5 **Ejemplo 6: Experimento de inhibición del crecimiento de tumores in vivo**

Los resultados obtenidos in vitro se completaron con estudios in vivo en un modelo de xenoinjerto. Para ello, en ratones desnudos (nude mice) se inocularon subcutáneamente 10<sup>7</sup> células HepG2 de hepatoblastoma humano. Después de la formación del tumor sólido (es decir, cuando el volumen del tumor alcanzaba 100 mm<sup>3</sup>), los ratones desnudos que tenían tumor se alocaron de manera aleatoria en cuatro grupos experimentales, cada uno con ocho ratones. Estos grupos se trataron mediante inyección peritumoral con 0,1 ml de DMSO (5%), BSO (90 mg/kg/día), AZA (6 mg/kg/día) y BSO (90 mg/kg/día) + AZA (6 mg/kg/día), respectivamente. Los tratamientos tanto con DMSO como con BSO se administraron todos los días hasta un total de 12 días. El tratamiento con AZA se administró en días alternos. El tamaño del tumor se midió todos los días. Al final del experimento, todos los animales fueron sacrificados. Además, también se determinaron los niveles plasmáticos de creatina quinasa (CK), alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST) en los cuatro grupos de ratones, siguiendo los procedimientos indicados por el fabricante (Spinreact). El análisis estadístico se realizó usando el paquete GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Los valores se presentan como media ± SEM y se evaluaron mediante una prueba estadística. El nivel de significación estadística se fijó en P<0.05. Los resultados mostraron que sólo la combinación de AZA más BSO produjo una reducción significativa del volumen del tumor con respecto a animales tratados con DMSO (figuras 10 y 11). El tratamiento con AZA más BSO produjo una disminución en los niveles de GSH en el tumor con respecto a tumores correspondientes de animales tratados con DMSO (figura 12). Sin embargo, el tratamiento con AZA más BSO no producía un incremento significativo de enzimas ALT, AST y CK en el plasma con respecto a animales tratados con AZA (figuras 13, 14 y 15), indicando que la asociación AZA plus BSO no da lugar a un aumento de la toxicidad propia a la AZA.

#### 25 **Ejemplo 7: Composición farmacéutica**

La composición farmacéutica fue preparada diluyendo en primer lugar 2 mg/kg de AZA en el mínimo volumen de DMSO. A continuación, la dilución anterior se emulsionó junto con 90 mg/kg de BSO en Intralipid® 10%.

## REIVINDICACIONES

1. Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario.
2. Uso según la reivindicación 1, en que dicho tumor refractario es un cáncer.
- 5 3. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es un blastoma.
4. Uso según la reivindicación 3, en que dicho blastoma es un hepatoblastoma
5. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es un carcinoma.
6. Uso según la reivindicación 5, en que dicho carcinoma es un carcinoma hepático.
7. Uso según la reivindicación 5, en que dicho carcinoma es un carcinoma de colon.
- 10 8. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es una metástasis de un carcinoma de colon.
9. Uso según la reivindicación 2, en que dicho cáncer es una metástasis de un cáncer primario de hígado.
10. Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno.
- 15 11. Uso de azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con L-butionina-[S,R]-sulfoximina o sus sales farmacéuticamente aceptables.
12. Uso de L-butionina-[S,R]-sulfoximina o sus sales farmacéuticamente aceptables en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicho medicamento se usa en terapia combinada con azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables.
- 20 13. Combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de un tumor refractario.
14. Una combinación según la reivindicación 13, en que dicho tumor refractario es un cáncer.
15. Una combinación según la reivindicación 14, en que dicho cáncer es un blastoma.
- 25 16. Una combinación según la reivindicación 15, en que dicho blastoma es un hepatoblastoma.
17. Una combinación según la reivindicación 14, en que dicho cáncer es un carcinoma.
18. Una combinación según la reivindicación 17, en que dicho carcinoma es un carcinoma hepático.
19. Una combinación según la reivindicación 17, en que dicho carcinoma es un carcinoma de colon.
20. Una combinación según la reivindicación 14, en que dicho cáncer es una metástasis de un carcinoma de colon.
- 30 21. Una combinación según la reivindicación 14, en que dicho cáncer es una metástasis de un cáncer primario de hígado.
22. Combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario, donde dicha combinación se usa en terapia combinada con un agente anticancerígeno.
- 35 23. Azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables para el tratamiento contra un tumor refractario en terapia combinada con L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables.



24. L-butionina-[S,R]-sulfoximina o sus sales farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento contra un tumor refractario en terapia combinada con azatioprina o sus sales farmacéuticamente aceptables.
25. Composición farmacéutica que comprende la combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina, o sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 5 26. Una composición farmacéutica según la reivindicación 25, para el tratamiento de un tumor refractario en un sujeto.
27. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 25 ó 26, que se administra en el tracto gastrointestinal de un sujeto.
- 10 28. Una composición farmacéutica según las reivindicaciones 25 ó 26, que se administra por vía endovenosa o por vía peritumoral.
29. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 28, caracterizada por que dicha composición es una emulsión.
30. Una composición farmacéutica según la reivindicación 29, caracterizada por que dicha emulsión es una emulsión grasa.
- 15 31. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 30, caracterizada por que dicho sujeto es un mamífero.
32. Una composición farmacéutica según la reivindicación 31, caracterizada por que dicho mamífero es un paciente humano.
- 20 33. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, caracterizada por que la administración de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina se realiza de forma simultánea.
34. Una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 32, caracterizada por que la administración de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina se realiza de forma separada o secuencial.
- 25 35. Kit que incluye contenedores separados que contienen al menos dos formulaciones farmacéuticas que comprenden azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina conjuntamente o por separado, junto con excipientes farmacéuticamente aceptables e instrucciones para el uso de uno de esos componentes en conjunción con el otro componente.
36. Kit que comprende azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina aptos para su administración simultánea, separada o secuencial para el tratamiento de un tumor gastrointestinal en un sujeto.
37. Un kit según las reivindicaciones 35 ó 36, en que dicho sujeto es un paciente humano.
- 30

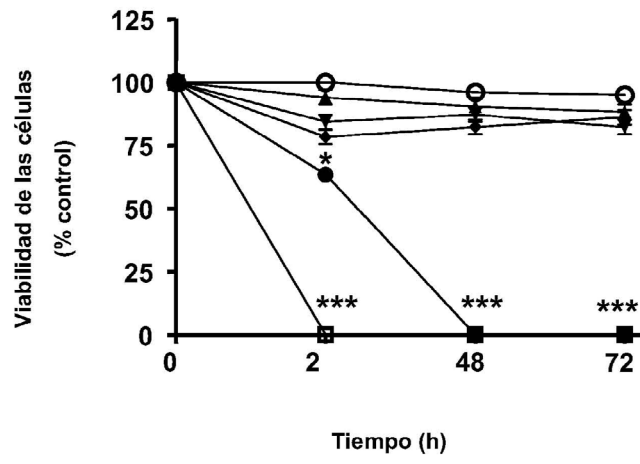


Fig. 1

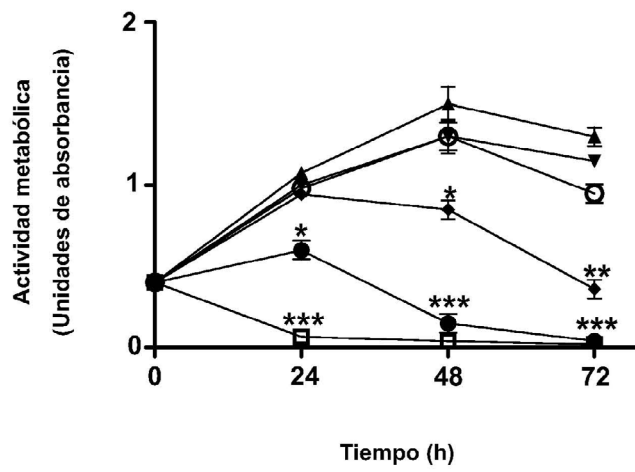


Fig. 2

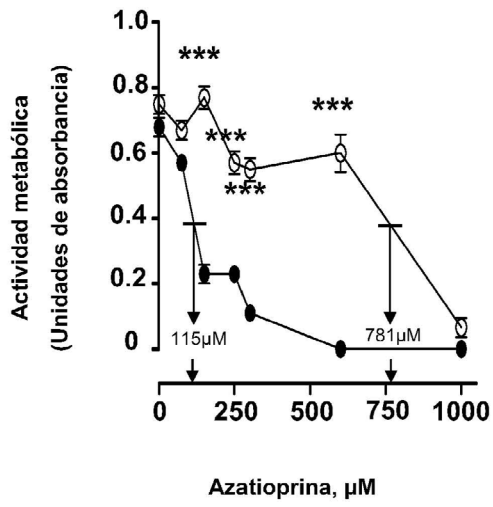


Fig. 3

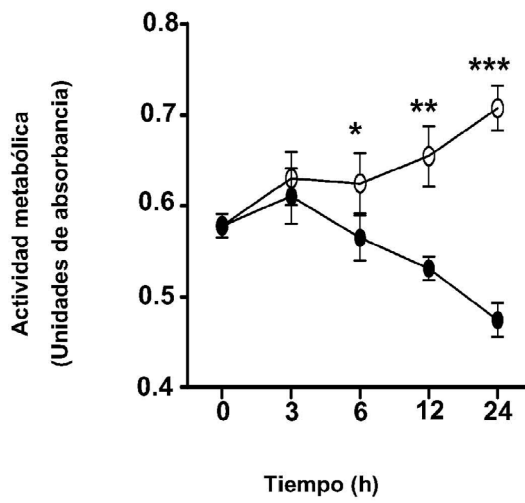


Fig. 4

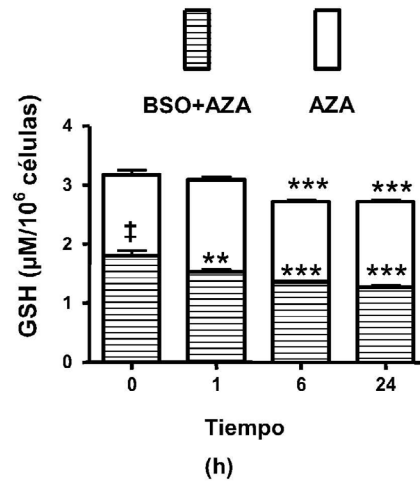


Fig. 5

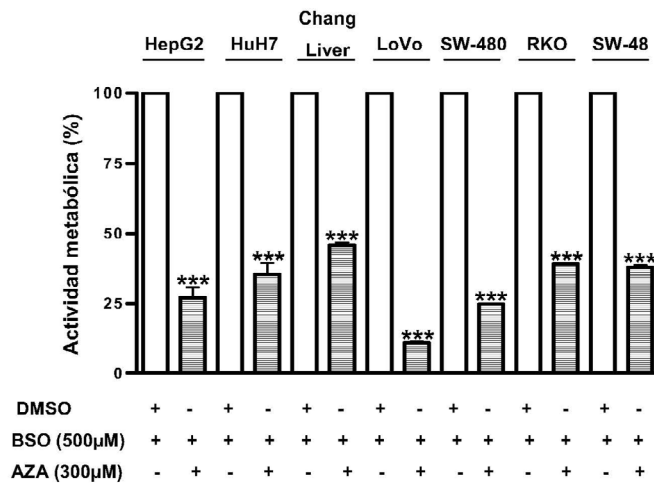
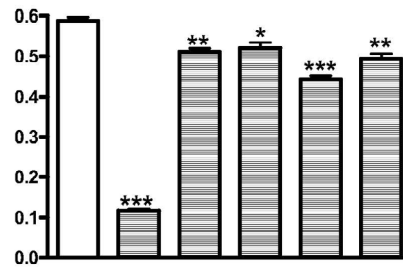


Fig. 6



DMSO	+	-	-	-	-	-
BSO(500µM)	+	+	+	+	+	+
AZA(300µM)	-	+	-	-	-	-
6-MP(300µM)	-	-	+	-	-	-
6-MMP(300µM)	-	-	-	+	-	-
6-TG(300µM)	-	-	-	-	+	-
6-MTG(300µM)	-	-	-	-	-	+

Fig. 7

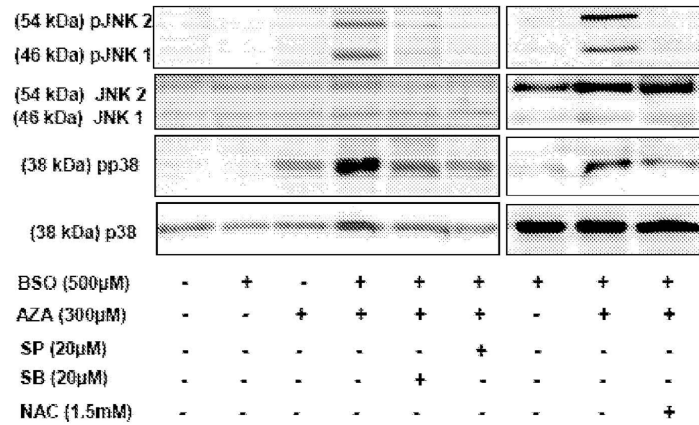


Fig. 8

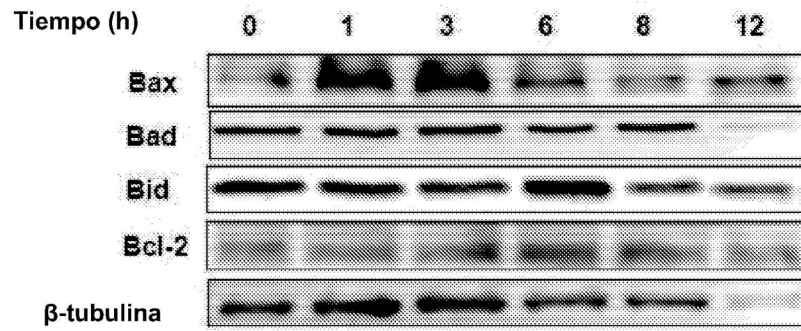


Fig. 9

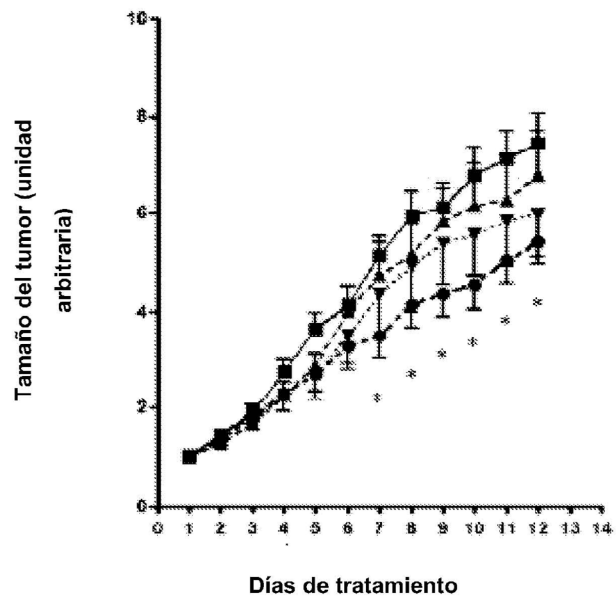


Fig. 10

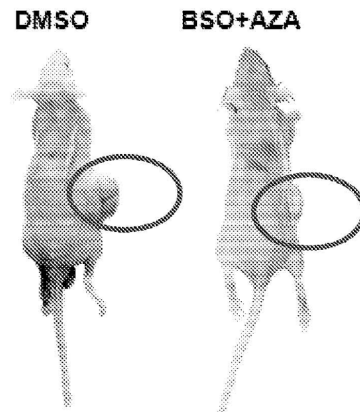


Fig. 11

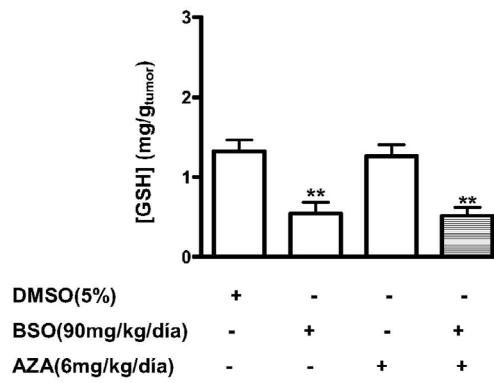


Fig. 12

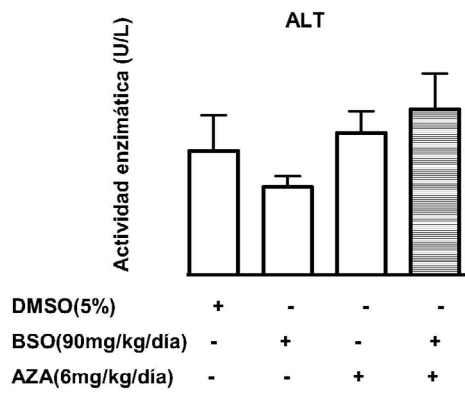


Fig. 13

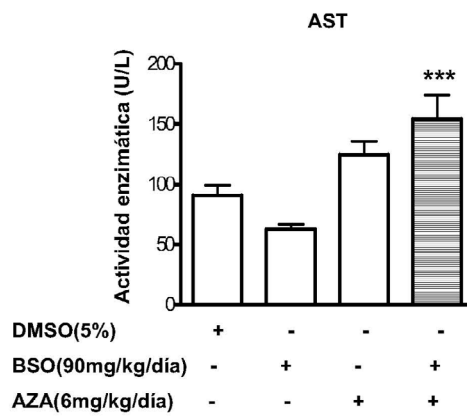


Fig. 14



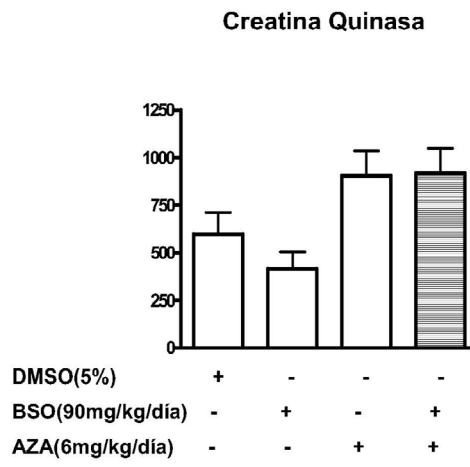


Fig. 15

# (12) International Application Status Report

Received at International Bureau: 24 September 2012 (24.09.2012)

Information valid as of: 13 January 2013 (13.01.2013)

Report generated on: 05 March 2013 (05.03.2013)

**(10) Publication number:**

WO2013/017724

**(43) Publication date:**

07 February 2013 (07.02.2013)

**(26) Publication language:**

Spanish (ES)

**(21) Application Number:**

PCT/ES2012/070593

**(22) Filing Date:**

30 July 2012 (30.07.2012)

**(25) Filing language:**

Spanish (ES)

**(31) Priority number(s):**

P201131315 (ES)

**(31) Priority date(s):**

29 July 2011 (29.07.2011)

**(31) Priority status:**

Priority document received (in compliance with PCT Rule 17.1)

**(51) International Patent Classification:**

A61K 31/52 (2006.01); A61K 31/198 (2006.01); A61P 35/00 (2006.01)

**(71) Applicant(s):**

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ [ES/ES]; Plaza de San Diego E-28801 Alcala de Henares (ES) *(for all designated states except US)*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID [ES/ES]; Ciudad Universitaria Cantoblanco C/ Einstein, 3. E-28049 Madrid (ES)

*(for all designated states except US)*

GONZÁLEZ GUIJARRO, Luis [ES/ES]; Plaza de San Diego E-28801 Alcala de Henares (ES) *(for US only)*

HERNÁNDEZ-BREIJO, Borja [ES/ES]; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES) *(for US only)*

ROMÁN CURTO, Irene de los Dolores [ES/ES]; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES) *(for US only)*

FERNÁNDEZ MORENO, María de los Dolores [ES/ES]; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES) *(for US only)*

PÉREZ GISBERT, Javier [ES/ES]; Ciudad Universitaria Cantoblanco C/ Einstein, 3. E-28049 Madrid (ES) *(for US only)*

**(72) Inventor(s):**

GONZÁLEZ GUIJARRO, Luis; Plaza de San Diego E-28801 Alcala de Henares (ES)

HERNÁNDEZ-BREIJO, Borja; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES)

ROMÁN CURTO, Irene de los Dolores; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES)

FERNÁNDEZ MORENO, María de los Dolores; Plaza de San Diego E-28801 Alcalá de Henares (ES)

PÉREZ GISBERT, Javier; Ciudad Universitaria Cantoblanco C/ Einstein, 3. E-28049 Madrid (ES)

**(74) Agent(s):**

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel; Goya 11 E-28001 Madrid (ES)

**(54) Title (EN):** USE OF A COMBINATION OF AZATHIOPRINE AND L-BUTHIONINE-[S,R]-SULFOXIMINE IN THE PREPARATION OF A DRUG USEFUL IN THE TREATMENT OF A REFRACTORY TUMOR

**(54) Title (FR):** UTILISATION D'UNE COMBINAISON D'AZATHIOPRINE ET DE L-BUTIONINE-[S,R]-SULFOXIMINE DANS LA PRÉPARATION D'UN MÉDICAMENT UTILE POUR LE TRAITEMENT D'UNE TUMEUR RÉFRACTAIRE

**(54) Title (ES):** USO DE UNA COMBINACIÓN DE AZATHIOPRINA Y L-BUTIONINA-[S,R]-SULFOXIMINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE UN TUMOR REFRACTARIO

**(57) Abstract:**

**(EN):** The present invention relates to the use of a combination of azathioprine (AZA) and L- buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), or the pharmaceutically suitable salts thereof, in the preparation of a drug useful in the treatment of a refractory tumor, preferably cancer. The combination in the invention has been shown to be especially effective, in particular in the treatment of solid tumors of the liver, colon and colon metastasis to the liver, tumors that are highly resistant to chemotherapy. The invention likewise relates to the pharmaceutical composition containing the combination and to the kit containing same.

**(FR):** La présente invention concerne l'utilisation d'une combinaison d'azathioprine (AZA) et de L-butionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), ou de leurs sels pharmaceutiquement acceptables, dans la préparation d'un médicament utile pour le traitement d'une tumeur réfractaire, de préférence un cancer. La combinaison de l'invention s'est révélée particulièrement efficace par rapport à la

technique antérieure, notamment dans le traitement de tumeurs solides du foie et du côlon et de la métastase du côlon dans le foie, tumeurs présentant une haute résistance à la chimiothérapie. L'invention concerne également une composition pharmaceutique renfermant cette combinaison et une trousse contenant ladite composition.

**(ES):** La presente invención describe el uso de una combinación de azatioprina (AZA) y L- butionina-[S,R]-sulfoximina (BSO), o sus sales farmacéuticamente aceptables, en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario, preferiblemente cáncer. La combinación de la invención se ha mostrado como especialmente eficiente respecto de la técnica en particular en el tratamiento de tumores sólidos de hígado, de colon y de metástasis de colon en el hígado, tumores que presentan gran resistencia a la quimioterapia. La invención también protege la composición farmacéutica en la que se presenta la combinación y el kit que contiene

#### **International search report:**

Received at International Bureau: 20 December 2012 (20.12.2012) [ES]

#### **International Report on Patentability (IPRP) Chapter II of the PCT:**

Not available

#### **(81) Designated States:**

AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

European Patent Office (EPO) : AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR

African Intellectual Property Organization (OAPI) : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

African Regional Intellectual Property Organization (ARIPO) : BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

Eurasian Patent Organization (EAPO) : AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
7 de febrero de 2013 (07.02.2013) WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2013/017724 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:  
A61K 31/52 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61K 31/198 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2012/070593

(22) Fecha de presentación internacional:  
30 de julio de 2012 (30.07.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:  
P201131315 29 de julio de 2011 (29.07.2011) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):  
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ [ES/ES]; Plaza de San Diego, E-28801 Alcala de Henares (ES). UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID [ES/ES]; Ciudad Universitaria Cantoblanco, C/ Einstein, 3., E-28049 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):  
GONZÁLEZ GUIJARRO, Luis [ES/ES]; Plaza de San Diego, E-28801 Alcala de Henares (ES). HERNÁNDEZ-

BREIJO, Borja [ES/ES]; Plaza de San Diego, E-28801 Alcalá de Henares (ES). ROMÁN CURTO, Irene de los Dolores [ES/ES]; Plaza de San Diego, E-28801 Alcalá de Henares (ES). FERNÁNDEZ MORENO, María de los Dolores [ES/ES]; Plaza de San Diego, E-28801 Alcalá de Henares (ES). PÉREZ GISBERT, Javier [ES/ES]; Ciudad Universitaria Cantoblanco, C/ Einstein, 3., E-28049 Madrid (ES).

(74) Mandatarios: CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel et al.; Goya 11, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible):

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: USE OF A COMBINATION OF AZATHIOPRINE AND L-BUTHIONINE-[S,R]-SULFOXIMINE IN THE PREPARATION OF A DRUG USEFUL IN THE TREATMENT OF A REFRACTORY TUMOR

(54) Título : USO DE UNA COMBINACIÓN DE AZATIOPRINA Y L-BUTIONINA-[S,R]-SULFOXIMINA EN LA PREPARACIÓN DE UN MEDICAMENTO ÚTIL PARA EL TRATAMIENTO DE UN TUMOR REFRACTARIO

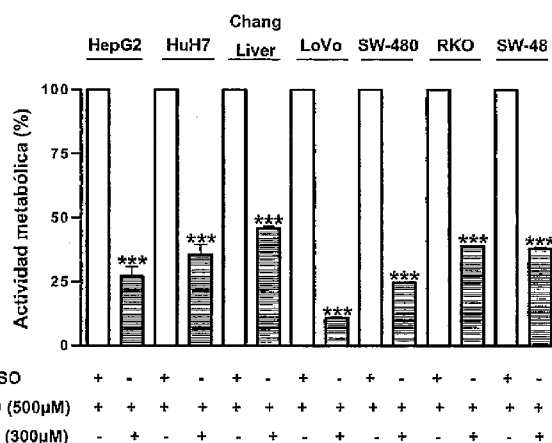


Fig. 6

(57) Abstract: The present invention relates to the use of a combination of azathioprine (AZA) and L- buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), or the pharmaceutically suitable salts thereof, in the preparation of a drug useful in the treatment of a refractory tumor, preferably cancer. The combination in the invention has been shown to be especially effective, in particular in the treatment of solid tumors of the liver, colon and colon metastasis to the liver, tumors that are highly resistant to chemotherapy. The invention likewise relates to the pharmaceutical composition containing the combination and to the kit containing same.

(57) Resumen:

[Continúa en la página siguiente]



WO 2013/017724 A1



Universidad  
de Alcalá

## *DISCUSIÓN FINAL*

---

---

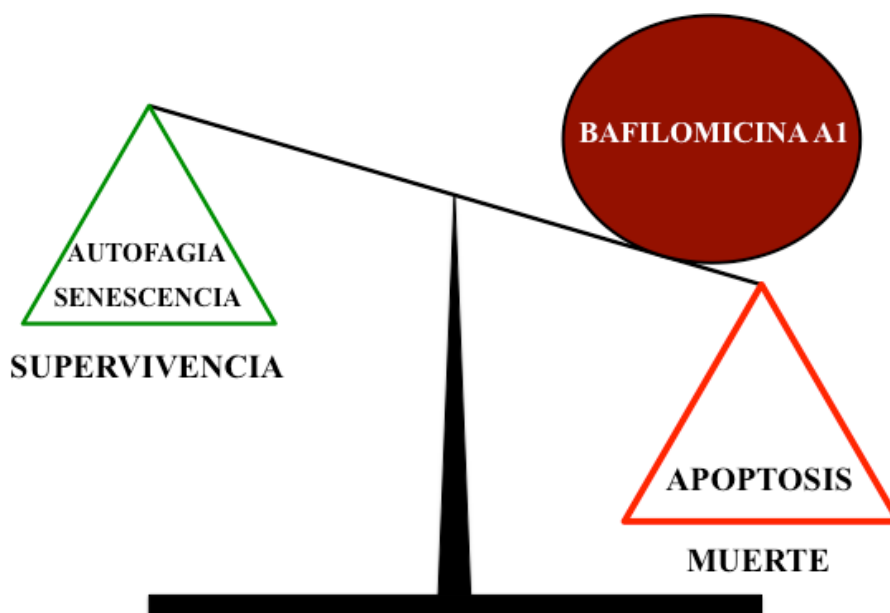
*“Un poco de ciencia aleja de Dios, pero  
mucha ciencia devuelve a Él”*

**Louis Pasteur**



El objetivo de la presente tesis es la búsqueda de nuevas aplicaciones de la azatioprina en combinación con otros fármacos para el tratamiento del cáncer.

En los capítulos I y II hemos demostrado que la azatioprina a concentraciones farmacológicas ( $EC_{50} = 10\text{-}25\mu\text{M}$ ) fue capaz de producir autofagia en células de hepatoblastoma, HepG2, inhibiendo los efectos del IGF-1 sobre la proliferación. Hemos demostrado que el efecto de la AZA es dependiente de la activación de la proteína p70S6K a través de la ruta de señalización de Ras/ERK/TSC-2/mTOR/p70S6K, produciéndose la fosforilación de IRS-1 en el residuo de Ser307 y la degradación del mismo, probablemente por la vía del proteosoma, lo que da lugar a la desensibilización de la célula al IGF-1 [Bose SK et al, 2012], [Arvisais E et al, 2010]. Proceso de desensibilización dio lugar la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR lo que probablemente activó la autofagia celular [Chen M et al, 2013]. Además, la AZA inhibió la fosforilación de FOXO1, lo que puede interferir en el ciclo celular [Sengupta A et al, 2009]. En este sentido se observó la ralentización del ciclo en G2/M, junto con la sobreexpresión de p21, características del proceso de senescencia. Recientemente se ha demostrado una conexión entre la autofagia y la senescencia [Young ARJ et al, 2009], [White E et al, 2009], lo cual sugieren también nuestros resultados. Sin embargo, la autofagia producida por la activación de ERK/p70S6K, no produjo muerte celular, en este sentido se ha sugerido que dicho proceso permitiría a la célula obtener energía para prolongar su supervivencia [Kawaguchi T et al, 2011], [Kanematsu S et al, 2010]. Sin embargo, el bloqueo de la autofagia en sus etapas finales por bafilomicina A1, produjo muerte celular por apoptosis, lo que sugiere que la asociación de esta molécula con azatioprina podría ser de utilidad en la terapia del cáncer, sobre todo en aquellos tumores que dependan del IGF-1, por ejemplo en cánceres pediátricos [Shin E et al, 2011], [Kim SY et al, 2009], [Adesina AM et al, 2009]. En la actualidad ya han sido publicadas varias patentes (por ejemplo: WO2010151005, KR1020020011528, KR1020110045303) para el tratamiento del cáncer en las que se incluyen inhibidores de la autofagia, como la hidroxicloroquina. Además, hay numerosos ensayos clínicos activos [Goldberg SB et al, 2012], [Yang ZJ et al, 2011] en los que se utiliza dicha molécula para el tratamiento del cáncer.



**Fig.36: El co-tratamiento con Bafilomicina A1 desplaza la balanza celular hacia la muerte debido al bloqueo final de la autofagia y a la inhibición de la senescencia celular.**

Es importante destacar, como se indicaba en el capítulo I, que la azatioprina activa la autofagia por un mecanismo molecular distinto al que tiene lugar con la 6-tioguanina. La azatioprina produce su efecto sobre la célula en un corto plazo de tiempo (antes de las 12h), en cambio la 6-tioguanina (6-TG) necesita al menos 3 días para activar la autofagia; esto es debido a que, como indica el grupo de Kinsella en sus investigaciones [Zeng X et al, 2007], [Zeng X et al, 2008], la 6-tioguanina necesita incorporarse al ADN y que se active el sistema de reparación MMR del ADN (“*DNA mismatch repair*”), dicho proceso está mediado por la activación de p53. Aunque la AZA y la 6-TG son moléculas que pertenecen a la misma familia, actúan por mecanismos diferentes y por lo tanto tienen perfiles farmacológicos y toxicológicos diferentes por lo que no deberían usarse de la misma manera.

En el capítulo III y en la patente (“Uso de una combinación de azatioprina y L-butionina-[S,R]-sulfoximina en la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de un tumor refractario”) hemos demostrado que la azatioprina también puede provocar muerte celular por necrosis a concentraciones superiores ( $EC_{50}= 80\mu M$ ), a la indicada en los capítulos I y II, cuando se asocia a una molécula que inhibe la síntesis de glutatión como el BSO (L-butionina-[S,R]-sulfoximina) [Vahrmeijer AL et



al, 1999]. Como se muestra en el capítulo III, hemos demostrado que en la combinación de BSO con las diferentes moléculas de la familia de las tiopurinas (AZA, 6-MP, 6-MMP, 6-TG y 6-MTG) sólo se obtuvieron resultados sinérgicos para el tratamiento de las células cancerosas cuando se combinaron AZA y BSO. Esta combinación fue efectiva en todas las líneas celulares de cáncer de hígado y de colon, que fueron probadas. Estos resultados sugieren que la combinación azatioprina y BSO actúa por un mecanismo completamente diferente al resto de las tiopurinas en el que podría estar involucrado la enzima GST (glutathion-S-transferasa) [Derijks LJJ et al, 2010].

La adición de NAC (N-acetilcisteína) recupera a la célula de los daños necróticos ocasionados por AZA plus BSO, pero no revierte del proceso de muerte celular por apoptosis, lo que pone de manifiesto la importancia del GSH en la transición de la apoptosis a la necrosis. Esta evidencia confiere al NAC un papel modulador de los efectos de AZA plus BSO en la terapia del cáncer.

Como se ve en los resultados del capítulo III y en la patente, esta combinación que proponemos de BSO y AZA posee un amplio espectro de acción ya que es capaz de generar muerte celular en 3 líneas celulares de cáncer de hígado (HepG2, HuH7 y Chang Liver) y en 4 líneas celulares de cáncer de colon (LoVo, SW480, RKO y SW48). Pero debido a la potencia farmacológica de la AZA ( $EC_{50} = 80 \mu M$ ) en presencia de BSO, pensamos que su aplicación sistémica no sería de utilidad porque las concentraciones requeridas para provocar un efecto terapéutico podrían generar mielotoxicidad. Por ello sugerimos, y la patente lo reivindica, un tratamiento local del tumor, como los que habitualmente se emplean en el estadio B y C del cáncer de hígado según la estratificación de pacientes propuesta por BCLC. Concretamente en la quimioembolización transarterial (TACE) en combinación con lipiodol [Shin SW, 2009] o agentes similares. Previamente ya se había comprobado la eficacia del BSO, en combinación con otras moléculas como el trióxido de arsénico [Maeda H et al, 2004] o el melphalan [Vahrmeijer AL et al, 1999], en el tratamiento de tumores sólidos. Hemos comprobado su eficacia administrado localmente en un modelo *in vivo* de xenotransplante de HepG2 en ratones atímicos. Como resultado hemos obtenido una reducción estadísticamente significativa del tamaño del tumor cuando tratamos con la combinación de BSO y AZA, sin efectos adversos observables ni en el comportamiento de los ratones, ni en los niveles séricos de transaminasas (ausencia de daño hepático) y

creatina quinasa (ausencia de daño muscular); lo que sugiere que el tratamiento combinado con AZA y BSO tiene un riesgo de toxicidad aceptable.

En conclusión podemos sugerir que la azatioprina podría ser de utilidad terapéutica en el tratamiento del cáncer, en los siguientes supuestos:

1. Asociada a bafilomicina A1 en tumores en los que la AZA active la autofagia a concentraciones bajas ( $EC_{50} = 10-25 \mu M$ ).
2. Asociada a BSO en tumores resistentes al aumento del estrés oxidativo, a concentraciones más altas ( $EC_{50} = 80 \mu M$ ).

En conclusión, en la presente tesis doctoral hemos intentado dar a la azatioprina una nueva aplicación farmacológica, en concreto hemos demostrado que podría ser de utilidad en el tratamiento de tumores sólidos refractarios a la terapia convencional. La combinación de la azatioprina con otros fármacos, BSO y bafilomicina A1, puede conducir a la célula tumoral hacia la necrosis o hacia la apoptosis, lo cual podría ser de interés terapéutico.

En la figura 37 se muestran las hipótesis que nuestros datos han permitido formular sobre los mecanismos de inducción de necrosis (azatioprina + BSO) o apoptosis (azatioprina + bafilomicina A1) en las células de hepatoblastoma HepG2):

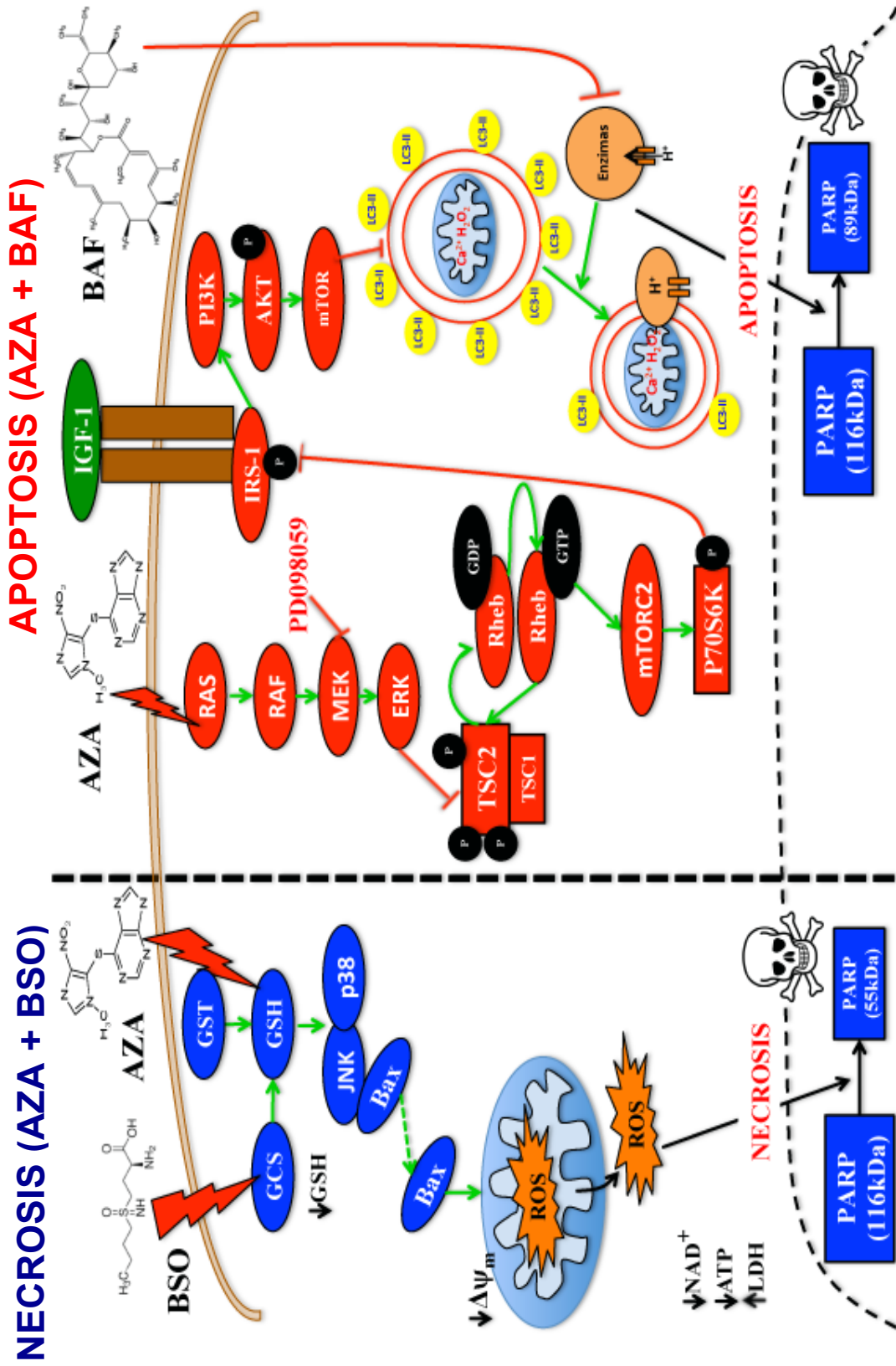


Fig.37: Esquema de la señalización celular producida por la azatioprina y descrita en esta tesis doctoral.





# *CONCLUSIONES*

---

---

*“La cosa más maravillosa que podemos experimentar es el misterio, fuente del verdadero arte y la verdadera ciencia”*

**Albert Einstein**



1. La azatioprina estimula la autofagia en las células HepG2 de manera dependiente de la activación de p70S6K.
2. La azatioprina produce la activación de la ruta de señalización Ras/Raf/ERK/TSC-2/mTOR/p70S6K en las células HepG2.
3. La activación sostenida de la proteína p70S6K mediante el tratamiento con azatioprina, conduce a la fosforilación del IRS-1 en el residuo Ser307, produciendo la degradación de ésta molécula adaptadora.
4. La degradación de IRS-1 da lugar a un proceso de desensibilización de las células HepG2 al IGF-1, con disminución de la asociación de IRS-1 a la enzima PI3K, así como la inhibición de la cascada AKT/p70S6K/FOXO1.
5. La desensibilización de las células HepG2 conduce a la inhibición de la proliferación y activación de la autofagia y senescencia.
6. Cuando el proceso autofágico estimulado por azatioprina se inhibe con bafilomicina A1, las células HepG2, mueren por apoptosis.
7. La azatioprina produce la disminución de los niveles de glutatión intracelular y cuando es combinado con un inhibidor de la síntesis de glutatión como L-butionina-[S, R]-sulfoximina produce muerte celular por necrosis en un panel de células cancerosas de hígado y de colon.
8. La muerte celular inducida por azatioprina y butionina sulfoximina fue dependiente de la activación de JNK y de p38 y provoca la alteración de la mitocondria.
9. La administración de dosis farmacológicas de azatioprina y butionina sulfoximina a tumores subcutáneos procedentes de la implantación de células HepG2 en ratones atímicos, produce la disminución significativa del volumen del tumor en relación a los correspondientes controles.
10. La administración de azatioprina y butionina sulfoximina en los ratones atímicos no produce elevación significativa de las enzimas ALT y de CK en plasma. La enzima AST se elevó, en el plasma de los ratones tratados con la combinación de AZA y BSO, un 70% con respecto al control, lo que sugiere que la toxicidad de la combinación de ambos fármacos es moderada.

**CONCLUSIÓN FINAL:** Esta tesis doctoral aporta los datos suficientes para tener en cuenta la azatioprina como una nueva terapia, en combinación con el BSO, para el tratamiento de manera local de tumores sólidos, como demuestran tanto los estudios *in vitro* como *in vivo*. Puede ser de utilidad en tumores altamente dependientes de IGF-1 en combinación con inhibidores de la autofagia y/o con terapias que tengan como diana los receptores celulares para factores de crecimiento. Por ello es de vital importancia descifrar el mecanismo de supervivencia predominante de cada tumor para clasificar el tumor molecularmente y aplicar la terapia más adecuada.





Universidad  
de Alcalá

# *ANEXOS*

---

---

*“El hombre con una idea nueva es un  
chiflado... hasta que la idea tiene éxito”*  
**Henry D. Thoreau**



## **ANEXO I**

### **CAPÍTULO DE LIBRO: LA AZATIOPRINA PRODUCE AUTOFAGIA EN CÉLULAS HEPG2**

Este anexo consiste en la publicación de un capítulo del libro titulado “Terceras jornadas de jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá” (I.S.B.N.: 978-84-8138-925-8) y de un DVD sobre las mismas, editados por el servicio de publicaciones de la Universidad de Alcalá con motivo de las jornadas con el mismo nombre, celebradas entre los días 1 al 3 de diciembre de 2010. Impartí una charla sobre el tema en cuestión en dichas jornadas Se adjunta el documento a continuación.

## LA AZATIOPRINA PRODUCE AUTOFAGIA EN CÉLULAS HepG2

B. Hernández-Breijo<sup>1,4</sup>, J. Monserrat<sup>2</sup>, D. Fernández-Moreno<sup>1,4</sup>, I.D. Román<sup>1,4</sup>, J.P. Gisbert<sup>3,4</sup>, L.G. Guijarro<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología. Universidad de Alcalá.

<sup>2</sup>Departamento de Medicina. Universidad de Alcalá

<sup>3</sup>Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitario de la Princesa e Instituto de Investigación Princesa (IP)

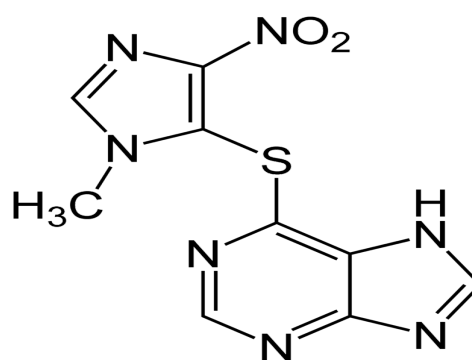
<sup>4</sup>Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepática y Digestivas (CIBERehd)

**Resumen:** Este trabajo trata de caracterizar los efectos autofágicos que produce la azatioprina (AZA) sobre la línea celular de hepatoblastoma humano HepG2. La azatioprina es un inmunosupresor ampliamente utilizado en los trasplantes de órganos y en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Alrededor del 5% de los pacientes tratados con azatioprina presentan hepatotoxicidad, asociada con reducción de los niveles de glutatión intracelular, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y activación de quinasas del estrés; conduciendo esto a procesos de muerte celular por apoptosis o necrosis, en función del modelo de hepatotoxicidad estudiado. Sin embargo, nada se sabe del efecto de la azatioprina sobre la autofagia. Para caracterizar el efecto de autofágico de la azatioprina sobre las células HepG2 utilizamos técnicas como inmunoblot, microscopía óptica, microscopía de fluorescencia confocal, microscopía electrónica y citometría de flujo. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la azatioprina incrementa la actividad lisosomal, la formación de vesículas autofágicas y la fragmentación de la proteína LC-3, todos ellos marcadores de autofagia en las células HepG2. Además, encontramos evidencias de la implicación de la proteína P70S6K en el proceso autofágico.

### 1. Introducción

**La azatioprina** es un profármaco inmunosupresor sintetizado por primera vez por la bioquímica y farmacóloga estadounidense Gertrude Bell Elion en el año 1962 como resultado de la búsqueda de análogos de la molécula 6-mercaptopurina (6-MP), a la cual se le introdujo un grupo imidazol para mejorar su biodisponibilidad y hacer que se libere más lentamente la molécula activa. Actualmente su uso está muy extendido en el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes, pero desde un principio se

empezó a utilizar para inmunodeprimir a los pacientes que sometidos a un trasplante de hígado, riñón o corazón; siendo la primera molécula que mostró eficacia para esta aplicación. Aunque la azatioprina sea un fármaco antiguo no quiere decir que sea un fármaco anticuado, ya que se sigue usando ampliamente y se continua investigando sobre él, como muestran las más de 17500 citas que hay en PubMed, de las cuales 551 pertenecen al año 2010. Además, la cifra de ensayos clínicos en curso con azatioprina asciende a 100, 5 de ellos en España. La azatioprina se usa el tratamiento de las enfermedades autoinmunes como alternativa a los corticosteroides, cuando estos no hacen efecto o no están indicados. Sus aplicaciones son las siguientes [1]: *desórdenes de la sangre no malignos* (anemia hemolítica autoinmune y púrpura trombocitopénica idiopática); *desórdenes del tejido conectivo y del tejido muscular* (síndrome de Behçet, polimiositis y lupus eritematoso sistémico); *desórdenes hepáticos no malignos* (remisión mantenida de la hepatitis autoinmune crónica y ralentización de la progresión de la cirrosis biliar primaria); *desórdenes pulmonares no malignos* (tratamiento de la enfermedad intersticial del pulmón); *desórdenes neuromusculares* (tratamiento de la miastenia gravis y también contribuye a mejorar de manera modesta a los pacientes con esclerosis múltiple recurrente-remitente clínicamente definida); *desórdenes oculares no malignos* (escleritis o uveitis); en estadios severos de la *artritis psoriática* y de la *artritis reumatoide*; en la *enfermedad inflamatoria intestinal* y *enfermedad de Crohn* cuando se complica con fistulas o con colitis ulcerosa refractaria; en la *sarcoidosis*; *desórdenes de la piel no malignos* (pénfigo vulgar, eccema atópico o dermatitis, prurigo nodular, pioderma gangrenoso, eritema multiforme y lupus eritematoso); y *síndromes vasculíticos* (arteritis temporal, poliarteritis microscópica, síndrome de Churg-Strauss o granulomatosis alérgica y granulomatosis de Wegener). La azatioprina (6-[1-metil-4-nitro-imidazol-5-il]-sulfanil-7H-purina) es un profármaco que hoy en día es producida por diferentes empresas farmacéuticas adoptando diversos nombres comerciales: *Azasan*, *Imuran*, *Imurel* o *Azamun*. Posee la estructura que se muestra en la figura 1. En



**Figura 1.** En la parte superior se muestra la estructura de la Azatioprina (CAS 446-86-6).

En la parte superior se muestra la estructura de la Azatioprina (CAS 446-86-6).

ella se puede apreciar que su estructura química está compuesta por una base de purina unida a un anillo imidazólico a través de un átomo de azufre (S). Se trata de un compuesto sólido de color amarillo pálido e inoloro y estable en condiciones normales de presión y temperatura, con un peso molecular de 277.3 g/mol. Es insoluble en agua y muy poco soluble en etanol y cloroformo, sin embargo es perfectamente soluble en dimetilsulfóxido (DMSO) dando disoluciones amarillas que no se conservan muy bien. Es sensible a la oxidación y descompone en disoluciones alcalinas fuertes. Su punto de fusión es 244°C y cuando se calienta a descomposición emite vapores tóxicos de óxido de nitrógeno y de óxido de azufre [2,3].

La azatioprina es un profármaco, es decir, una molécula con carácter terapéutico que en su lugar de acción se escinde dando lugar al fármaco para que realice la acción terapéutica. El mayor objetivo de los profármacos es mejorar la biodisponibilidad de la molécula que llevará a cabo la acción farmacológica. El primer paso del metabolismo de la azatioprina consiste en la escisión del profármaco, liberándose mediante la acción de la enzima *glutathion S-transferasa (GST)* y en presencia de *glutathion (GSH)* la base de purina del anillo imidazólico y dando lugar a la 6-mercaptopurina [4].

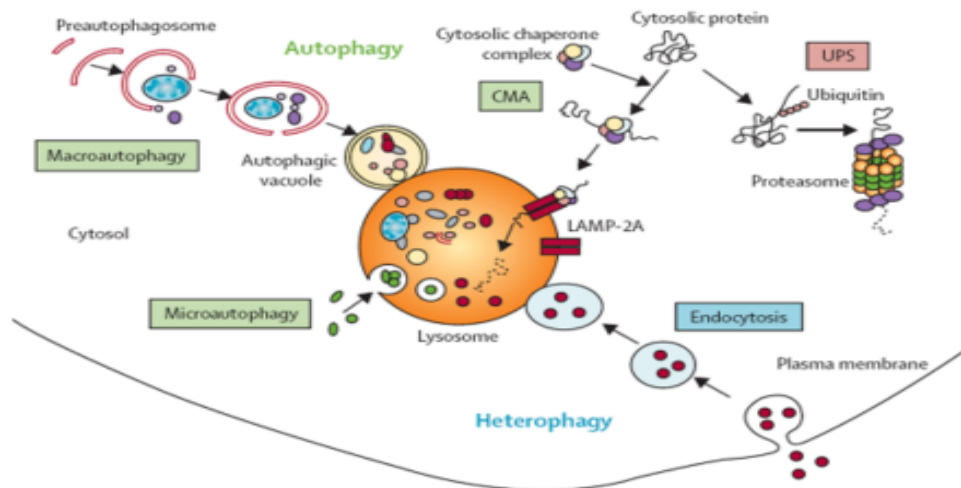
Uno de los procesos que ocurre en las células de manera habitual es **la autofagia**. La autofagia es un mecanismo de formación de vacuolas y de transporte del material citoplasmático al interior de estos compartimentos para ser degradado. Es un proceso altamente conservado en la evolución, ya que se tiene constancia de autofagia desde organismos como las levaduras y se da en prácticamente todas las células. Para que se produzca la autofagia hace falta que se aporte energía en la célula en forma de ATP porque se trata de un proceso catabólico y además no es un proceso que ocurra de manera aleatoria en las células sino que está fuertemente regulado. La autofagia está implicada en muchos mecanismos celulares como son:

- El crecimiento celular, la morfogénesis y la diferenciación celular.
- La homeostasis celular (proceso implicado en el balance síntesis-degradación de componentes celulares).

- La adaptación a la privación de nutrientes y la regulación del metabolismo (por ejemplo en la eliminación de enzimas).
- La remodelación tisular (ya que contribuye a la eliminación de las células del tejido que se remodela) y el envejecimiento.
- La defensa celular (eliminando patógenos que entran en la célula y pretenden atacarla).

Cuando la autofagia se ve desregulada o perturbada se pueden producir procesos perjudiciales para el individuo como son el cáncer, enfermedades hepáticas e inmunes, infección por patógenos, miopatías y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Huntington, el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) [5].

Existen tres tipos de autofagia diferentes: la autofagia mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia. Se explican brevemente a continuación quedando reflejados en la figura 2.



**Figura 2.** Esquema que muestra los diferentes tipos de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia y macroautofagia. (Extraída de [http://www.mdc-berlin.de/en/research/research\\_teams/proteomics\\_and\\_molecular\\_mechanisms\\_of\\_neurodegenerative\\_diseases/research/research2/index.html](http://www.mdc-berlin.de/en/research/research_teams/proteomics_and_molecular_mechanisms_of_neurodegenerative_diseases/research/research2/index.html))

**-Mediada por chaperonas (CMA):** Es un tipo de autofagia en la que se ven involucradas un tipo de proteínas que están implicadas en el plegamiento de otras

proteínas, conocidas como chaperonas. Este proceso autofágico se va a encargar de degradar las proteínas que por impedimentos estéricos no se puedan degradar por la vía del proteosoma. Una condición indispensable es que presenten el motivo proteico KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln), para que puedan ser reconocidas por ese sistema y puedan atravesar la membrana lisosomal. La diferencia con la macro y microautofagia es que en la autofagia mediada por chaperonas los materiales a degradar son transportados uno a uno a través de la membrana del lisosoma; y además se degradarán sólo proteínas y no se degradarán organelos.

**-Microautofagia:** Es un tipo de autofagia que consiste en que el lisosoma toma por sí mismo los componentes citosólicos (incluyendo macromoléculas como el glucógeno) y organelos, por invaginación. Es un proceso que no está sometido a regulación metabólica.

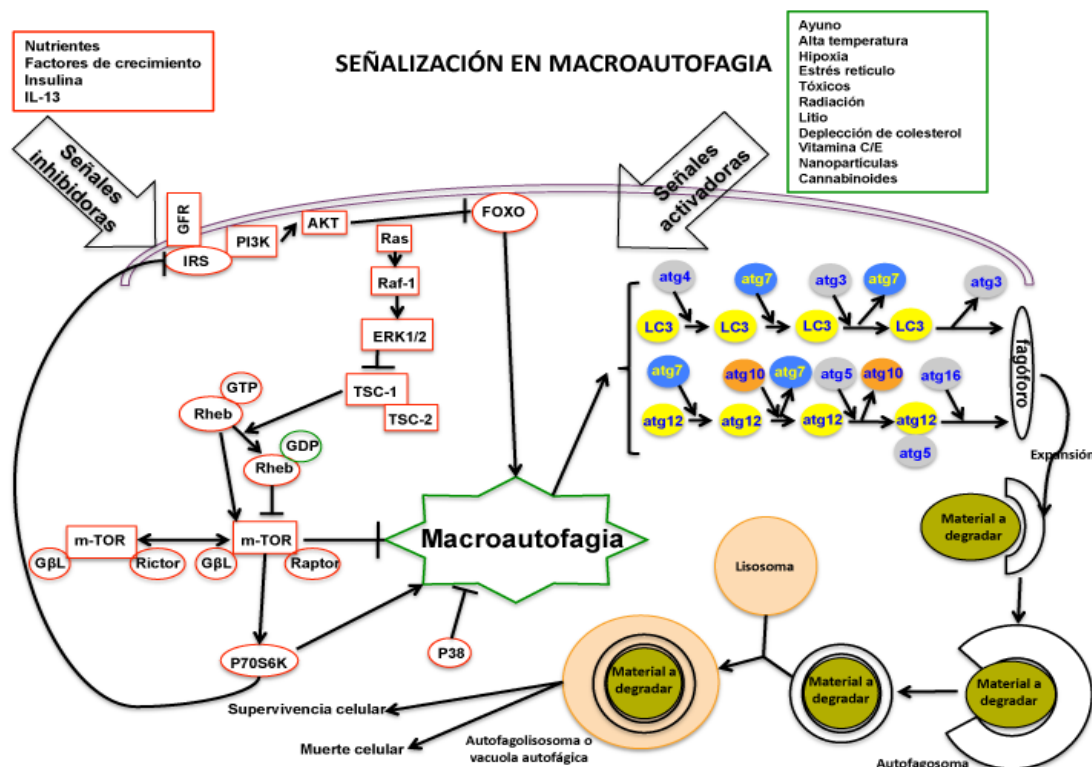
**-Macroautofagia:** Es el tercer tipo de autofagia que se caracteriza por la presencia de vacuolas con doble o múltiple membranas, cuya formación está muy conservada desde las levaduras a los humanos. La ruta de la macroautofagia en células de mamíferos comienza con el secuestro del material citoplasmático para formar el autofagosoma temprano (primario). Se sugiere que la membrana de los autofagosomas tempranos proviene de una especializada cisterna de membrana, de origen aún no clarificado, denominada fagoforo; además, el reclutamiento de membranas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi podrían también contribuir. La formación de las vesículas autofágicas (autofagolisosomas) resulta de la fusión de autofagosomas maduros con lisosomas; de esta manera, la degradación del material citoplasmático se desencadena. Las proteínas del citoesqueleto son parte esencial en este proceso; el secuestro del material a degradar requiere de filamentos intermedios (citoqueratina y vimentina), dado que el movimiento y fusión de los lisosomas con los autofagosomas maduros necesita el sistema de los microtúbulos. Todos estos pasos, incluido el de la degradación final del material secuestrado, son ATP dependientes y por lo tanto, dependientes de energía.

A partir de ahora nos centraremos más en la macroautofagia dado que la autofagia que tiene lugar en las células HepG2 (línea celular de hepatoblastoma humano), cuando son tratadas con azatioprina.



Como se ha comentado anteriormente en la introducción, la autofagia no es un proceso que ocurra aleatoriamente si no que está muy regulado por una señalización celular de la cual, en los últimos años, se va sabiendo cada vez más. En la figura 3 se muestra esquemáticamente parte de la señalización que tiene lugar en la macroautofagia, donde se puede apreciar como se va formando poco a poco la estructura del autofagosolisosoma desde el fagóforo, pasando por el autofagosoma que se unirá al lisosoma para dar lugar al autofagosolisosoma o vacuola autofágica.

Una vez formada la vesícula autofágica se producirá señalización hacia supervivencia o muerte celular. Cuando se trata de una señalización que conduce hacia muerte celular, ésta se producirá por macroautofagia directamente o podrá producirse por macroautofagia que señalice posteriormente hacia apoptosis [6]. Cuando la muerte ocurre directamente por macroautofagia se inician una serie de procesos característicos en el núcleo y en el citoplasma celular que la diferencian de otros tipos de muerte como



**Figura 3.** Esquema que muestra parte de la señalización que ocurre en la célula cuando se produce macroautofagia. Se pueden apreciar las diferentes señales activadoras o proautofágicas y las señales inhibidoras o antiautofágicas, así como el proceso de formación de la vacuola autofágica. (Modificada de Enzo® Life Sciences)

son la muerte por apoptosis o la muerte por necrosis; estas características son las que siguen [6]:

**-Características del núcleo:** condensación parcial de la cromatina, núcleo intacto hasta las últimas fases de la muerte y ausencia de fragmentación del ADN.

**-Características del citoplasma:** aumento del número de vesículas autofágicas, aumento de la actividad lisosomal, alargamiento del aparato de Golgi y dilatación del retículo endoplásmico, gran del número de mitocondrias cercanas al núcleo y a las vesículas autofágicas. Es un proceso caspasa-independiente.

## 2. Materiales y métodos

**Cultivos celulares:** Se utilizan las líneas celulares HepG2, HuH7, Chang Liver, RKO, SW-48 y SW-480 mantenidas en DMEM (Gibco, Invitrogen) con un 1% de antibiótico-antimicótico (Gibco, Invitrogen), a 37°C y un 5% de CO<sub>2</sub>.

**Compuestos:** Se utilizan Azatioprina (cedido por UCB Pharma S.A.), Dimetil sulfóxido (Sigma-Aldrich), Naranja de acridina (Invitrogen). Anticuerpos: LC-3 (Sigma-Aldrich), p-P70S6K *Thr421/Ser424* (SantaCruz Biotechnology), P70S6K (SantaCruz Biotechnology).

**Western Blot:** Se obtuvieron los extractos de proteínas totales de las células [7], siendo calculada la concentración por el método de Bradford; se cargaron las proteínas en un gel SDS-PAGE de electroforesis y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. El Western Blot fue desarrollado como en [7].

**Microscopía electrónica:** Después de los tratamientos correspondientes se desadherieron las células con tripsina-EDTA y se centrifugaron. Sobre el *pellet* obtenido se añadió glutaraldehído al 3%, y se dejó 2h en tampón *milloning*, entonces se fijó con OsO<sub>4</sub> (1%) durante 1h y se lavó con agua destilada. Se deshidrató con acetona en gradiente de concentración. Se incluyeron las piezas en resina araldita. Luego se hicieron cortes semifinos y posteriormente ultrafinos y se recogieron los cortes en rejillas de cobre donde se tiñeron con citrato de plomo durante 3 minutos.

Se observaron en el microscopio electrónico (modelo microscopio de transmisión ZEISS EM-109M10).

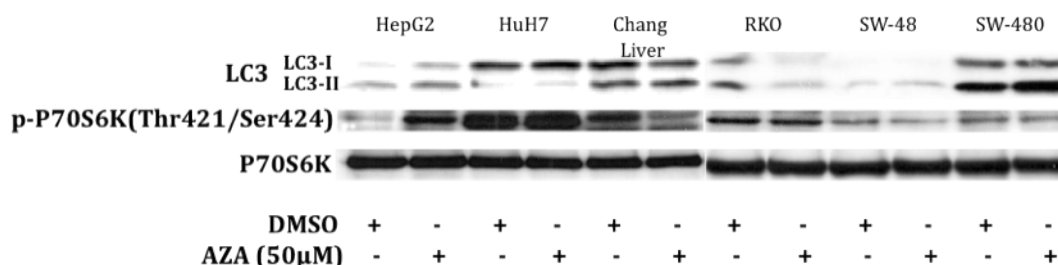
**Microscopía de fluorescencia confocal:** Las células se sembraron sobre cubreobjetos introducidos en placas de cultivo y después se trataron. Se incubaron con naranja de acridina (1 $\mu$ M) durante 17 minutos a 37°C, lavándose después los cubres con PBS (1X) y adheriéndose con FluorSave (Calbiochem) a los portas. Finalmente, los portas fueron observados en el microscopio *Confocal Leica TSC-SP5*.

**Citometría de flujo:** Las células tratadas fueron incubadas con naranja de acridina (1 $\mu$ M) durante 17 minutos y después fueron examinadas en el citómetro de flujo.

### 3. Resultados

#### 3.a. Especificidad de las células HepG2 a la azatioprina

Las células HuH7 (hepatocarcinoma), HepG2 (hepatoblastoma), Chang Liver (células de hígado inmortalizadas), RKO (carcinoma de colon), SW-48 (adenocarcinoma colorectal) y SW-480 (adenocarcinoma colorectal) fueron tratadas con azatioprina (50 $\mu$ M) durante 12 horas. Se realizó el Western Blot de LC-3 (proteína marcadora de autofagia), de p-P70S6K (thr421/Ser424) y de proteína total. Se observó que HepG2 es la única línea celular en la que parece haber una relación entre la activación de P70S6K y el aumento de autofagia, (figura 4).

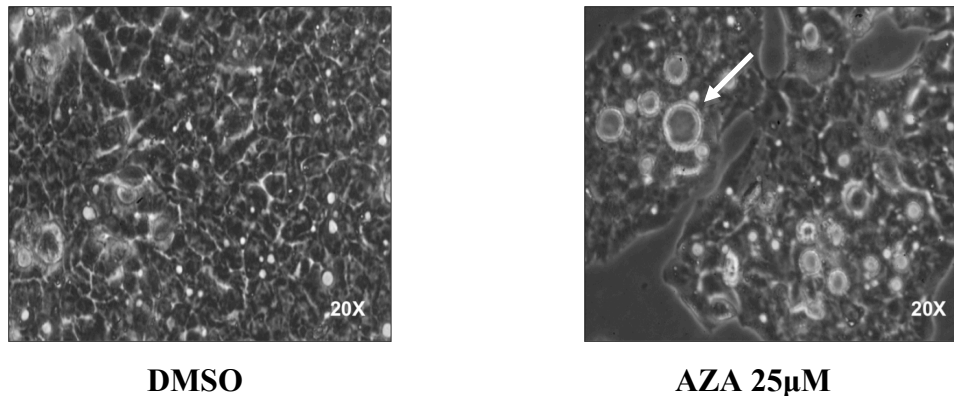


**Figura 4.** Western Blots de LC-3, p-P70S6K y P70S6K. Vemos como sólo en las HepG2 se relaciona la activación de la P70S6K con el aumento de LC-3 cuando las células se tratan con azatioprina.

### ***3.b. Caracterización de la autofagia por microscopía óptica y microscopía electrónica***

Las células HepG2, por experimentar un aumento en los niveles de LC-3 en el tratamiento con azatioprina y por ser nuestro modelo de estudio habitual, fueron analizadas más en detalle para caracterizar la autofagia. El primer paso fue la observación de este fenómeno celular a través del microscopio óptico (figura 5), para posteriormente, acercarnos al nivel nanométrico a través del microscopio electrónico (figura 6), pudiendo valorar las características a las que hemos referido en la introducción.

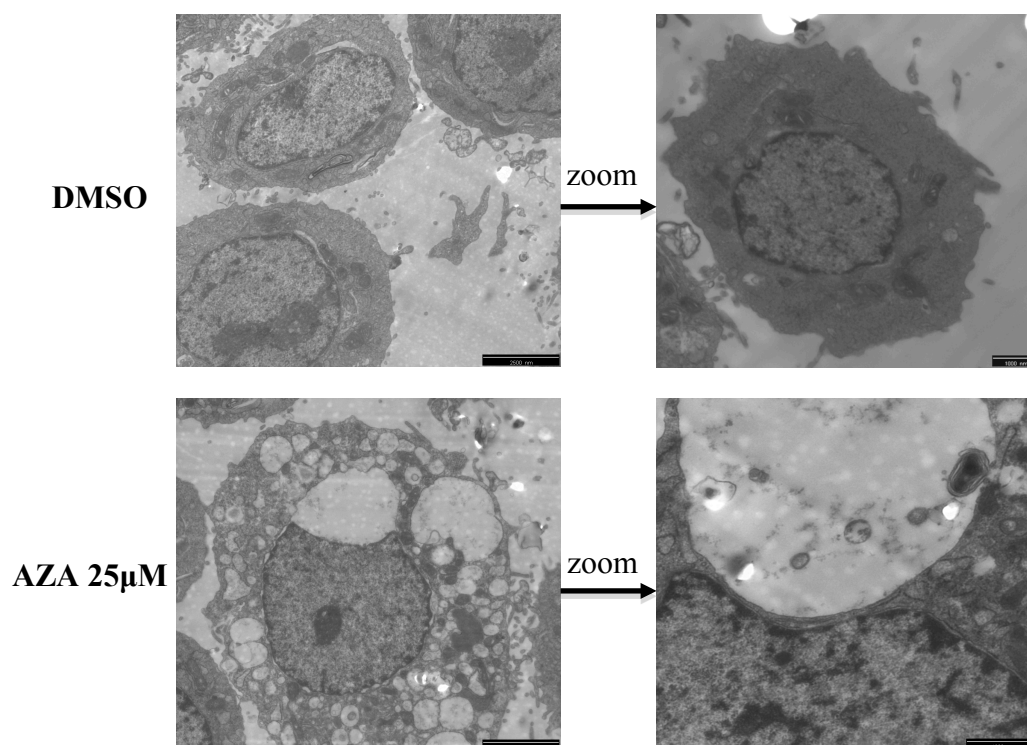
La microscopía electrónica nos muestra que al tratar con azatioprina aparecen vacuolas autofágicas y al aumentar el zoom del microscopio se observan acúmulos de material celular en el interior de las mismas, acumulación de mitocondrias próximas a estas vacuolas y condensación nuclear parcial. En cambio, cuando se trata con el vehículo (DMSO) no observamos ningún cambio (figura 6).



**Figura 5.** Microscopía óptica (20x). Se aprecia que al tratar con azatioprina, las células HepG2 generan las vacuolas autofágicas.

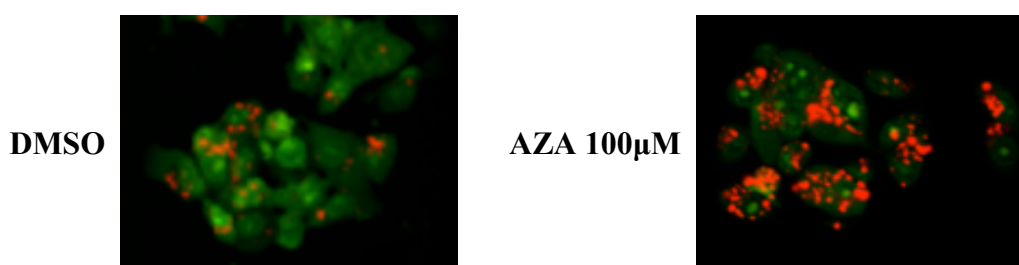
### ***3.c. Caracterización cualitativa de la autofagia por tinción con naranja de acridina y visualización por microscopía de fluorescencia confocal***

Las células HepG2 fueron tratadas con azatioprina (100µM) durante 42 horas. Se tiñieron posteriormente con naranja de acridina y se visualizaron en el microscopio de fluorescencia confocal a las longitudes de onda de absorción correspondientes a la naranja de acridina. La naranja de acridina es un compuesto que tiñe ácidos nucleicos a



**Figura 6.** Microscopía electrónica. Se aprecia que al tratar con azatioprina las células HepG2 se generan las vacuolas autofágicas y se observan los acúmulos en el interior de las mismas, además de la condensación de la cromatina y de la disposición de las mitocondrias.

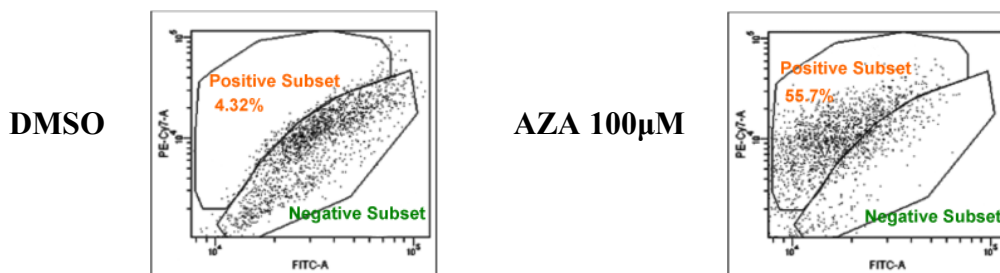
la longitud de onda del verde y que tiñe organelos a pH ácido a la longitud de onda del rojo. Por lo tanto el aumento de señal roja es una medida cualitativa del aumento de organelos ácidos y por consiguiente una medida indirecta del aumento de autofagia debido al pH ácido de los autofagolisosomas. Observamos que la azatioprina aumenta de manera estadísticamente significativa el número de organelos ácidos. Lo podemos ver en la figura 7 donde se refleja el canal rojo.



**Figura 7.** Microscopía de fluorescencia confocal con naranja de acridina. Se aprecia que al tratar con azatioprina las células HepG2 se generan los organelos ácidos.

### 3.d. Caracterización cuantitativa de la autofagia por tinción con naranja de acridina y citometría de flujo

Las células HepG2 fueron tratadas con azatioprina (100 $\mu$ M) durante 42 horas. Transcurrido este tiempo se tiñieron con naranja de acridina y se introdujeron en el citómetro de flujo. El 56% de las células se tiñieron con naranja de acridina en el tratamiento con azatioprina (figura 8).



**Figura 8.** Citometría de flujo con naranja de acridina. Se aprecia que al tratar con azatioprina se tiñen un 56% de las células, lo que indica el porcentaje de células que están en autofagia.

## 4. Conclusión

A la vista de los resultados obtenidos y de los resultados ya existentes en la bibliografía, podemos afirmar que la azatioprina a concentraciones bajas produce autofagia en las células HepG2 específicamente y que está relacionada con la vía de señalización de la proteína P70S6K. Esta conclusión se hace más sólida gracias a las pruebas de microscopía, inmunoblot y citometría de flujo realizadas.

## Bibliografía

- [1] Parfitt, K. 1999. The complete drug reference (Martindale). PhP(pharmaceutical press), UK. 2315 pp.
- [2] HSDB (Hazardous Substances Database), 2003 <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> National Library of Medicine.

- [3] IARC. 1981. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 26. France. 411 pp.
- [4] L.J.J. Derijks and D.R. Wong. Pharmacogenetics of Thiopurines in Inflammatory Bowel Disease. *Current Pharmaceutical Design*, **16**, 145-154, 2010.
- [5] B. Levine and G. Kroemer. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*, **132**, 27-42, 2008.
- [6] D. Gozuacik and A. Kimchi. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891-2906, 2004.
- [7] E.P. Cuevas, O. Escribano, A. Chiloehes, S. Ramirez-Rubio, I.D. Román, M.D. Fernández-Moreno, L.G. Guijarro. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol* **46**, 1089-1098, 2007.





## ANEXO II

### GERTRUDE BELL ELION: UNA BIOGRAFÍA INDISPENSABLE

Es mi intención hacer mención en esta tesis doctoral, a modo de homenaje, a Gertrude Bell Elion, científica estadounidense y descubridora, entre otras moléculas, de la azatioprina, parte esencial y sin la cual no tendría sentido este trabajo.

Gertrude Bell Elion nació en 1918 en Nueva York en una noche muy fría de enero, en la cual hasta se congelaban y se rompían las tuberías de su casa, en el seno de una familia de emigrantes. Afortunadamente, su madre pudo llegar a tiempo a un hospital. Su padre emigró a Estados Unidos desde Lituania a la edad de 12 años. Tuvo acceso a la educación superior y se graduó como dentista en la Universidad de Nueva York en 1914. Su madre llegó de Polonia (Rusia en aquella época) a los 14 años y se casó con Mr. Elion a la edad de 19 años. Gertrude vivió sus primeros 7 años de vida en un apartamento en Manhattan que servía a la vez de consulta de su padre. Cuando nació su hermano se trasladaron al humilde barrio del Bronx donde Gertrude y su hermano tuvieron una infancia feliz. Acudían a una escuela cercana a su casa y desde muy pequeña Gertrude demostraba una sed insaciable por aprender.

Llegó el momento de acabar sus estudios fundamentales y tuvo que enfrentarse al dilema de saber a qué dedicaría el resto de su vida. El acontecimiento que hizo decidirse a Elion fue que su abuelo murió de cáncer cuando ella contaba con 15 años. Ella estaba muy unida a su abuelo y esto motivó enormemente a Gertrude a dedicar su vida en encontrar una cura para esta terrible enfermedad. Así que decidió comenzar a estudiar química en 1933 en el *Hunter College* de Nueva York donde se graduó en 1937. Muchas de sus compañeras pudieron seguir estudiando en la Universidad después de graduarse, pero Elion no pudo seguirles debido a la depresión económica en la que estaba sumida Estados Unidos, en esos momentos.



**Gertrude en 1922**

El trabajo escaseaba y las vacantes que había en los laboratorios no estaban destinadas a las mujeres, aún así pudo conseguir un empleo por tres meses como profesora de bioquímica en la *New York Hospital School of Nursing*. Después de esta breve etapa, conoció a un químico que la contrató como ayudante de laboratorio, con un sueldo de 20 dólares por semana, que además le pagaba con retraso, lo que la impulsó a abandonar este trabajo un año y medio después. No obstante, gracias al mismo pudo ahorrar el dinero necesario para entrar en 1939 en la Universidad de Nueva York. Era la única mujer en su clase, pero esto no le importaba, y después de un año consiguió realizar los cursos necesarios para optar al grado de Máster. Durante este periodo formativo también trabajó como profesora en prácticas y como sustituta en diferentes escuelas secundarias de Nueva York enseñando química, física y ciencias en general. Como consecuencia de tan intensa actividad diurna, tuvo que realizar sus trabajos de laboratorio de noche y durante los fines de semana. De esta forma, se graduó en 1941.

La IIª Guerra Mundial había comenzado y había gran escasez de químicos. Encontró trabajo en un laboratorio, pero no de investigación si no en control de calidad en una compañía alimentaria. Al principio el trabajo le parecía atractivo porque aprendía muchas técnicas nuevas, pero con el tiempo se hizo monótono y repetitivo, lo que le llevó a buscar trabajo a través de una agencia de empleo y fue seleccionada para un puesto en el laboratorio de *Johnson & Johnson* en New Jersey, pero desafortunadamente fue desmantelado a los seis meses. Después de lo cual le ofrecieron trabajo en diferentes laboratorios de investigación, pero Elion se interesó por una plaza en los laboratorios *Burroughs Wellcome* (actual *Glaxo Wellcome*) bajo la dirección de George Hitchings. Esta nueva etapa saciaría su sed de conocimiento en el campo de la química orgánica, a la par que la prepararía para asumir responsabilidades más adelante. Más tarde también se desenvolvería perfectamente en microbiología y en el estudio de la actividad biológica de los compuestos que ella misma sintetizaba.



**Elion en el laboratorio con Stan Bushby y el Dr. Hitchings, 1972.**

Nunca se vio limitada en su trabajo y pudo explorar otras áreas como la bioquímica, la farmacología, la inmunología y eventualmente la virología. Gertrude ansiaba conseguir el doctorado así que comenzó a asistir de noche al Brooklyn Polytechnic Institute. Después de un periodo en el que compaginó los estudios y el trabajo en el laboratorio de Hitchings, le exigieron dedicarse a su doctorado a tiempo completo. Esta fue una decisión muy importante en su vida y eligió dejar el sueño del doctorado para centrarse en su trabajo. Años más tarde recibiría tres títulos de doctor "honoris causa" por la Universidad George Washington, por la Universidad de Brown y por la Universidad de Michigan, lo cual le hizo darse cuenta de que esa decisión tan difícil que había tomado había sido la adecuada, pero desafortunadamente sus padres ya no vivían para verlo.

Encontró el trabajo en el laboratorio del Dr. Hitchings fascinante desde el principio. Exploraron nuevas fronteras, relacionadas con la biosíntesis de los ácidos nucleicos, así como con las enzimas implicadas en dichas rutas. Le asignaron, muy pronto, el estudio de las purinas; aunque también hizo experimentos en el campo de las pteridinas y de la síntesis de sistemas condensados de pirimidinas. De cada serie de estudios realizados intentaba deducir el significado microbiológico que estos tenían. A mediados de los años 50, Greenberg, Buchanan y Kornberg publicaron un trabajo en el cual elucidaban las rutas de biosíntesis y utilización de purinas, y gracias a esto, muchos de los hallazgos de Elion cobraron sentido y comenzaron a ver la luz según las necesidades médicas y el beneficio de los pacientes. Esto llenó de satisfacción a Gertrude porque vio recompensados muchos años de esfuerzo y trabajo.

Era una avezada fotógrafa y le encantaba viajar. También le gustaba mucho asistir a la ópera y estuvo suscrita al *Metropolitan Opera* durante 40 años. Le encantaban también los conciertos, el ballet y el teatro. No tuvo niños pero le encantaba disfrutar de la compañía de sus sobrinos, eran una familia muy unida a pesar de la distancia.



**Gertrude Elion en 1982,  
el año antes de retirarse  
oficialmente de  
Burroughs Wellcome.**

En cuanto a su carrera profesional obtuvo rápidamente puestos de responsabilidad. En 1967 fue nombrada directora del Departamento de Terapia Experimental de *Burroughs Wellcome*, puesto que ejerció hasta que se retiró en 1983. Estuvo también asociada al *National Cancer Institute (NCI)* desde 1960 donde formó parte de distintos comités y fue parte activa de la Sociedad Americana para la Investigación del Cáncer de la cual fue presidenta en 1983 y 1984. Además fue miembro de la *Leukemia Society of America*, de *Tropical Disease Research division* (de la Organización Mundial de la Salud), del *Steering Committee on the Chemotherapy of Malaria*, de la *American Chemical Society*, de la *Royal Society of Chemistry*, de la *Transplantation Society*, de la *American Society of Biological Chemists*, de la *American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, de la *American Association for Cancer Research*, de la *American Society of Hematology*, de la *American Association for the Advancement of Science*, de la *American Association of Pharmaceutical Scientists* y perteneció a la *New York Academy of Sciences Organization*. Después de retirarse como directora de departamento en *Burroughs Wellcome* en 1983 se convirtió en profesora de investigación de medicina y farmacología en la Universidad de Duke, en Durham, Estados Unidos; donde estuvo hasta el final de su vida, en 1999.



**Elion recibe el premio Nobel en 1988.**

En cuanto a sus publicaciones podemos decir que hay constancia de un número de 177, entre los años 1947 y 2000, y su nombre aparece en 45 patentes. En 1988, por la síntesis y desarrollo de inhibidores de las rutas metabólicas claves que llevan a la síntesis del ADN, se le concedió el premio Nobel en Medicina y Fisiología junto George Hitchings, su antiguo colaborador, y Sir James Black; siendo una de las diez mujeres que han recibido un Nobel en ciencias y uno de los pocos premiados en ciencias que lo han recibido sin tener el doctorado. En 1991 se convirtió en la primera mujer que entró a formar parte del *Inventor's Hall of Fame* y premiada con la Medalla Nacional de la Ciencia por el presidente George Bush [Elion GB, 1988], [Rosich Moya L et al, 2007].

Como he comentado anteriormente su trabajo se focalizó sobre todo en el estudio de las purinas, en concreto, la síntesis de análogos de purinas y antifolatos usados en quimioterapia. También inmunosupresores, antivirales y agentes antimicrobianos. Estos compuestos actúan como análogos de los metabolitos fisiológicos requeridos para la síntesis de purinas y pirimidinas.

Elion y Hitchings dedujeron que los análogos de purinas y pirimidinas podrían tener efectos inhibidores en tumores y microbios. Sintetizaron moléculas derivadas de purinas como la 6-mercaptopurina, la 6-tioguanina, la azatioprina, el alopurinol y el aciclovir. También derivados de pirimidinas como la pirimetamina (antimalárico), DDMP y BW301U (anticancerosos) y antifolatos como el trimetoprima (antibiótico) [Chabner BA, 1988].



## ANEXO III

### COMUNICACIONES A CONGRESOS

Durante esta tesis doctoral ha contribuido a presentar comunicaciones a congresos tanto internacionales (7) como nacionales (3). Son las siguientes:

- **Hernández-Breijo B**, Ramírez-Rubio S, Sánchez-Alonso V, Gisbert JP, Fernandez-Moreno MD, Roman ID, Guijarro LG. Azathioprine produces the oxidization of 53 kDa and 67 kDa proteins and induce mitochondrial dependent apoptosis in GSH HepG2 depleted cells. *44th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver (EASL)*. **2009**. Copenhague (Denmark). Publicado en *Journal of Hepatology*. 2009; 50 (S1): S260. **Índice de impacto: 9.264**
- **B. Hernández-Breijo**, J. Monserrat, M.D. Fernández-Moreno, I.D. Román, M. Álvarez de Mon, J.P. Gisbert, L.G. Guijarro. Azathioprine induces autophagy in HepG2 cells. Role of P70 S6 Kinase. *EASL Special Conference Hepatocellular Carcinoma: from Genomics to Treatment*. **2010**. Dubrovnik (Croatia). Publicado en el libro de abstracts del congreso.
- **B. Hernández-Breijo**. Azatioprina induce autofagia en células HepG2. *Terceras jornadas de jóvenes investigadores de la Universidad de Alcalá*. **2010**. Alcalá de Henares (Spain).
- **B. Hernández-Breijo**, J. Monserrat, Á. González-Rodríguez, M.D. Fernández-Moreno, I.D. Román, M. Álvarez de Mon, Á.M. Valverde, J.P. Gisbert, L.G. Guijarro. Azathioprine produces autophagy through ERK/mTOR/P70S6K pathway in HepG2 cells. *46th Annual Meeting of the European Association for the Study of the liver (EASL)*. 2011. Berlin (Germany). Publicado en *Journal of Hepatology*. **2011**; 54 (S1): S202. **Índice de impacto: 9.264**
- **Borja Hernandez-Breijo**, M. Dolores Fernández-Moreno, Irene D. Román, Javier P. Gisbert, Luis G. Guijarro. The role of p70S6K in the autophagy induced by azathioprine in HepG2 cells. *EMBO Meeting 2011*. **2011**. Vienna (Austria). Publicado en el libro de abstracts del congreso.



- **B. Hernández-Breijo**, J. Monserrat, I.D. Román, M.D. Fernández-Moreno, J.P. Gisbert, L.G. Guijarro. La combinación de Azatioprina y Bafilomicina A1 produce autofagia y apoptosis en células HepG2. *XV Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología*. **2012**. Madrid (Spain). Publicado en el libro de abstracts del congreso.
- **B Hernández-Breijo**, ID Román, MD Fernández-Moreno, J Monserrat, JP Gisbert, LG Guijarro. La azatioprina bloquea la proliferación celular y provoca autofagia en las células de hepatoblastoma por inhibición de la cascada del IGF-1. *XV Reunión Nacional de la Asociación Española de Gastroenterología*. **2012**. Madrid (Spain). Publicado en el libro de abstracts del congreso.
- **B Hernández-Breijo**, ID Román, MD Fernández-Moreno, J Monserrat, JP Gisbert, LG Guijarro. The autophagy produced by Azathioprine in HepG2 cells leads to apoptotic cell death due to inhibition with Bafilomycin A1. *DDW 2012 Congress*. 2012. San Diego (USA). Publicado en *Gastroenterology*. **2012**; 142 (5), Supplement 1: S452. **Índice de impacto: 11.675**
- **B Hernández-Breijo**, ID Román, MD Fernández-Moreno, J Monserrat, JP Gisbert, LG Guijarro. Azathioprine produces autophagy in hepatoblastoma cells by desensitization to insulin-like growth factor 1 (IGF-1). *DDW 2012 Congress*. 2012. San Diego (USA). Publicado en *Gastroenterology*. **2012**; 142 (5), Supplement 1: S452. **Índice de impacto: 11.675**
- **B Hernández-Breijo**, J Monserrat, MVT Lobo, JP Gisbert, LG Guijarro. Azathioprine produces senescence through desensitization to IGF 1 in human hepatoblastoma cells. *22<sup>nd</sup>IUBMB-37<sup>th</sup>FEBS-35<sup>th</sup>SEBBM*. 2012. Sevilla (Spain). Publicado en *FEBS Journal*. **2012**; 279, (Suppl. 1): 145. **Índice de impacto: 3.790**

Por otro lado he podido participar en 15 comunicaciones a congresos nacionales (5) e internacionales (10) contribuyendo a otros proyectos del laboratorio en relación al estudio molecular de la enfermedad inflamatoria intestinal y al estudio de la proteína IRS-4 en el hepatocarcinoma y en el cáncer de colon.

Además pude contribuir a la siguiente publicación científica:



Eva P. Cuevas, Oscar Escribano, Jorge Monserrat, Javier Martínez-Botas, María G. Sánchez, Antonio Chiloeches, **Borja Hernández-Breijo**, Verónica Sánchez-Alonso, Irene D. Román, M<sup>a</sup> Dolores Fernández-Moreno, and Luis G. Guijarro. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate-4 enhances actinomycin D- and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death in hepatocarcinoma cancer cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*. **2009**; 108: 1292-1301. **Índice de impacto: 3.122**



## **ANEXO IV**

### **PROYECTOS Y FINANCIACIÓN**

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos, los cuales han permitido la compra del material fungible e inventariable para la realización de los experimentos. Son los siguientes proyectos:

2008-2011: Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-05355). “Papel del EGF en la regeneración de la mucosa del colon durante la colitis ulcerosa. Implicación del IRS-4”. IP: Dr Luis G Guijarro.

2009-2011: Ministerio de Sanidad. Proyecto FIS-ISCI III (PS09/02369). “Implicación de los factores angiogénicos y linfangiogénicos en la enfermedad inflamatoria intestinal”. IP: Dr. Javier P. Gisbert.

2011: Universidad de Alcalá/ Comunidad de Madrid (CCG10-UAH/BIO-5). “Estudio de la cascada de señalización del IGF-1 en el colon de ratas que presentan enfermedad inflamatoria intestinal”. IP: Dr. Irene D. Román.

2012-2015: Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2423). “Estudio de los mecanismos de resistencia a insulina: implicaciones en obesidad, diabetes y síndrome metabólico”. IP: Dr. Manuel Ros.

2012: Universidad de Alcalá (UAH2011/BIO-007). “Papel del IGF-1/IRS-4 en la autofagia de las células de colon. Implicación de dicho proceso biológico en la colitis experimental”. IP: Dr Irene D. Román.





Universidad  
de Alcalá

# *BIBLIOGRAFÍA*

---

---

*“La verdadera ciencia enseña, por encima  
de todo, a dudar y a ser ignorante”*  
**Miguel de Unamuno**



- Adesina AM**, Lopez-Terrada D, Wong KK, Gunaratne P, Nguyen Y, Pulliam J, Margolin J, Finegold MJ. Gene expression profiling reveals signatures characterizing histologic subtypes of hepatoblastoma and global deregulation in cell growth and survival pathways. *Hum Pathol* 2009; 40: 843-53.
- Akcakanat A**, Singh G, Hung MC, Meric-Bernstam F. Rapamycin regulates the phosphorylation of rictor. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 362: 330-3.
- Altekruse SF**, McGlynn KA, Reichman ME. Hepatocellular carcinoma incidence, mortality, and survival trends in the United States from 1975 to 2005. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1485-91.
- Aoyagi Y**, Oguro M, Yanagi M, Mita Y, Suda T, Suzuki Y, Hata K, Ichii K, Asakura H. Clinical significance of simultaneous determinations of alpha-fetoprotein and des-gamma-carboxy prothrombin in monitoring recurrence in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 1781-6.
- Araki E**, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994; 372: 186-90.
- Armstrong GL**, Alter MJ, McQuillan GM, Margolis HS. The past incidence of hepatitis C virus infection: implications for the future burden of chronic liver disease in the United States. *Hepatology* 2000; 31: 777-82.
- Arvais E**, Hou X, Wyatt TA, Shirasuna K, Bollwein H, Miyamoto A, Hansen TR, Rueda BR, Davis JS. Prostaglandin F2alpha represses IGF-I-stimulated IRS1/phosphatidylinositol-3-kinase/AKT signaling in the corpus luteum: role of ERK and P70 ribosomal S6 kinase. *Mol Endocrinol* 2010; 24: 632-643.
- Awasthi YC**, Chaudhary P, Vatsyayan R, Sharma A, Awasthi S, Sharma R. Physiological and pharmacological significance of glutathione-conjugate transport. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2009; 12: 540-51.
- Bailey HH**, Ripple G, Tutsch KD, Arzoomanian RZ, Alberti D, Feierabend C, Mahvi D, Schink J, Pomplun M, Mulcahy RT, Wilding G. Phase I study of continuous-infusion L-S,R-buthionine sulfoximine with intravenous melphalan. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1789-96.

- Bastida G**, Nos P, Aguas M, Beltran B, Rubin A, Dasi F, Ponce J. Incidence, risk factors and clinical course of thiopurine-induced liver injury in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 775-82.
- Bergmann U**, Funatomi H, Kornmann M, Beger HG, Korc M. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 886-90.
- Bitto A**, Lerner C, Torres C, Roell M, Malaguti M, Perez V, Lorenzini A, Hrelia S, Ikeno Y, Matzko ME, McCarter R, Sell C. Long-term IGF-I exposure decreases autophagy and cell viability. *Plos One* 2010; 5: e12592.
- Blum HE**. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7391-400.
- Bodnar AG**, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
- Boissan M**, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lecluse Y, Housset C, Lacombe ML, Desbois-Mouthon C. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol* 2005; 167: 869-77.
- Bolondi L**, Gianstefani A. Management of liver cirrhosis and prognostic classification of hepatocellular carcinoma. *Hot topics in oncology. Hepatocellular carcinoma*. 2009; 5: 7-18.
- Bose SK**, Shrivastava S, Meyer K, Ray RB, Raya R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J Virol* 2012; 86: 6315-22.
- Breuhahn K**, Longrich T, Schirmacher P. Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2006; 25: 3787-800.
- Breuhahn K**, Vreden S, Haddad R, Beckebaum S, Stippel D, Flemming P, Nussbaum T, Caselmann WH, Haab BB, Schirmacher P. Molecular profiling of human hepatocellular carcinoma defines mutually exclusive interferon regulation and insulin-like growth factor II overexpression. *Cancer Res* 2004; 64: 6058-64.
- Bruix J**, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2005; 42: 1208-36.



- Bruix J**, Sherman M, Llovet JM, Beaugrand M, Lencioni R, Burroughs AK, Christensen E, Pagliaro L, Colombo M, Rodes J. Clinical management of hepatocellular carcinoma. Conclusions of the Barcelona-2000 EASL conference. European Association for the Study of the Liver. *J Hepatol* 2001; 35: 421-30.
- Buckley JD**, Sather H, Ruccione K, Rogers PC, Haas JE, Henderson BE, Hammond GD. A case-control study of risk factors for hepatoblastoma. A report from the Childrens Cancer Study Group. *Cancer* 1989; 64: 1169-76.
- Burchenal JH**, Murphy ML, Ellison RR, Sykes MP, Tan TC, Leone LA, Karnofsky DA, Craver LF, Dargeon HW, Rhoads CP. Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine, in the treatment of leukemia and allied diseases. *Blood* 1953; 8: 965-99.
- Cai D**, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem* 2003; 278: 25323-30.
- Campisi J**, Andersen JK, Kapahi P, Melov S. Cellular senescence: A link between cancer and age-related degenerative disease?. *Semin Cancer Biol* 2011; 21:354-9.
- Cara CJ**, Pena AS, Sans M, Rodrigo L, Guerrero-Esteo M, Hinojosa J, Garcia-Paredes J, Guijarro LG. Reviewing the mechanism of action of thiopurine drugs: towards a new paradigm in clinical practice. *Med Sci Monit* 2004; 10: RA247-54.
- Chabner BA**. In celebration of a Nobel Prize. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 1512-3.
- Chaitanya GV**, Babu PP. Differential PARP cleavage: an indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat. *Cell Mol Neurobiol* 2009 29: 563-573.
- Chaitanya GV**, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal* 2010; 8: 31.
- Chang Q**, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S. Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer Res* 2002; 62: 6035-8.
- Chen M**, Du Y, Qui M, Wang M, Chen K, Huang Z, Jiang M, Xiong F, Chen J, Zhou J, Jiang F, Yin L, Tang Y, Ye L, Zhan Z, Duan J, Fu H, Zhang X. Ophiopogonin B-induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via inhibition of the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Rep* 2013; 29: 430-6.

- Chen Y**, Yang Y, Miller ML, Shen D, Shertzer HG, Stringer KF, Wang B, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP. Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. *Hepatology* 2007; 45: 1118-28.
- Cheng BQ**, Jia CQ, Liu CT, Fan W, Wang QL, Zhang ZL, Yi CH. Chemoembolization combined with radiofrequency ablation for patients with hepatocellular carcinoma larger than 3 cm: a randomized controlled trial. *Jama* 2008; 299: 1669-77.
- Choi WS**, Sung CK. Characterization of insulin receptor substrate 3 in rat liver derived cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 953-8.
- Chotechuang N**, Azzout-Marniche D, Bos C, Chaumontet C, Gaudichon C, Tomé D. Down-regulation of the ubiquitin-proteasome proteolysis system by amino acids and insulin involves the adenosine monophosphate-activated protein kinase and mammalian target of rapamycin pathways in rat hepatocytes. *Amino Acids* 2011; 41: 457-68.
- Christofferson DE**, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22: 263-8.
- Correa Báez Y**, Vizcaíno Valderrama M. Hepatoblastoma. *Universitas médica* 2003; 44: 96-100.
- Coulthard SA**, Hogarth LA, Little M, Matheson EC, Redfern CP, Minto L, Hall AG. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity to thiopurine drugs. *Mol Pharmacol* 2002; 62: 102-9.
- Crawford DJ**, Maddocks JL, Jones DN, Szawlowski P. Rational design of novel immunosuppressive drugs: analogues of azathioprine lacking the 6-mercaptopurine substituent retain or have enhanced immunosuppressive effects. *J Med Chem* 1996; 39: 2690-5.
- Cuevas EP**, Escribano O, Chiloeches A, Ramirez Rubio S, Roman ID, Fernandez-Moreno MD, Guijarro LG. Role of insulin receptor substrate-4 in IGF-I-stimulated HEPG2 proliferation. *J Hepatol* 2007; 46: 1089-98.
- Cuevas EP**, Escribano O, Monserrat J, Martínez-Botas J, Sánchez MG, Chiloeches A, Hernández-Breijo B, Sánchez-Alonso V, Román ID, Fernández-Moreno MD, Guijarro LG. RNAi-mediated silencing of insulin receptor substrate-4 enhances

- actinomycin D- and tumor necrosis factor-alpha-induced cell death in hepatocarcinoma cancer cell lines. *J Cell Biochem* 2009; 108:1292-301.
- d'Adda di Fagagna F**, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426: 194-8
- D'Ambrosio C**, Keller SR, Morrione A, Lienhard GE, Baserga R, Surmacz E. Transforming potential of the insulin receptor substrate 1. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 557-62.
- Daniele B**, Di Maio M. Locoregional and systemic treatments for patients with hepatocellular carcinoma. *Hot topics in oncology. Hepatocellular carcinoma.* 2009; 5: 19-29.
- Darbari A**, Sabin KM, Shapiro CN, Schwarz KB. Epidemiology of primary hepatic malignancies in U.S. children. *Hepatology* 2003; 38: 560-6.
- DeAngelis T**, Chen J, Wu A, Prisco M, Baserga R. Transformation by the simian virus 40 T antigen is regulated by IGF-I receptor and IRS-1 signaling. *Oncogene* 2006; 25: 32-42.
- Derijks LJ**, Wong DR. Pharmacogenetics of thiopurines in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2010; 16: 145-54.
- Donato F**, Tagger A, Gelatti U, Parrinello G, Boffetta P, Albertini A, Decarli A, Trevisi P, Ribero ML, Martelli C, Porru S, Nardi G. Alcohol and hepatocellular carcinoma: the effect of lifetime intake and hepatitis virus infections in men and women. *Am J Epidemiol* 2002; 155: 323-31.
- EASL-EORTC**. EASL-EORTC Clinical Practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012; 56: 908-43.
- Edinger AL**, Thompson CB. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 16: 663-9.
- El-Serag HB**, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. *Gastroenterology* 2007; 132: 2557-76.
- El-Serag HB**, Siegel AB, Davila JA, Shaib YH, Cayton-Woody M, McBride R, McGlynn KA. Treatment and outcomes of treating of hepatocellular carcinoma among Medicare recipients in the United States: a population-based study. *J Hepatol* 2006; 44: 158-66.

- El-Serag HB**, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
- Elion GB**. 1988. The Nobel Prize in Physiology or Medicine. [consultado el 13 de julio de 2007]. Nobel Foundation.  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1988/elion-autobio.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1988/elion-autobio.html)
- Elion GB**. The purine path to chemotherapy. *Science* 1989; 244: 41-7.
- Ellerkamp V**, Armeanu-Ebinger S, Wenz J, Warmann SW, Schäfer J, Ruck P, Fuchs J. Successful Establishment of an Orthotopic Hepatoblastoma In Vivo Model in NOD/LtSz-scid IL2R $\gamma$ null Mice. *PLoS One* 2011; 6: e23419.
- Escribano O**, Fernández-Moreno MD, Zueco JA, Menor C, Fueyo J, Ropero RM, Diaz-Laviada I, Román ID, Guijarro LG. Insulin receptor substrate-4 signaling in quiescent rat hepatocytes and in regenerating rat liver. *Hepatology* 2003; 37: 1461-9.
- Fabregat I**, Roncero C, Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. *Liver Int* 2007; 27: 155-62.
- Fairbanks KD**, Tavill AS. Liver disease in alpha 1-antitrypsin deficiency: a review. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 2136-41.
- Fasshauer M**, Klein J, Kriauciunas KM, Ueki K, Benito M, Kahn CR. Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes. *Mol Cell Biol* 2001; 21: 319-29.
- Fernando J**, Sancho P, Fernandez-Rodriguez CM, Lledo JL, Caja L, Campbell J, Fausto N, Fabregat I. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol* 2012; 227: 1319-25.
- Festjens N**, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1757: 1371-87.
- Forner A**, Ayuso C, Varela M, Rimola J, Hessheimer AJ, de Lope CR, Reig M, Bianchi L, Llovet JM, Bruix J. Evaluation of tumor response after locoregional therapies in hepatocellular carcinoma: are response evaluation criteria in solid tumors reliable? *Cancer* 2009; 115: 616-23.
- Foster KG**, Fingar DC. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. *J Biol Chem* 2010; 285: 14071-7.

- Foulstone E**, Prince S, Zaccheo O, Burns JL, Harper J, Jacobs C, Church D, Hassan AB. Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *J Pathol* 2005; 205: 145-53.
- Fraser AG**, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002; 50: 485-9.
- Galluzzi L**, Kroemer G. Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis. *Cell* 2008; 135: 1161-3.
- Gardiner SJ**, Geary RB, Burt MJ, Ding SL, Barclay ML. Severe hepatotoxicity with high 6-methylmercaptopurine nucleotide concentrations after thiopurine dose escalation due to low 6-thioguanine nucleotides. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008; 20: 1238-42.
- Gerland LM**, Peyrol S, Lallemand C, Branche R, Magaud JP, Ffrench M. Association of increased autophagic inclusions labeled for beta-galactosidase with fibroblastic aging. *Exp Gerontol* 2003; 38:887-95.
- Gewirtz DA**. Autophagy, senescence and tumor dormancy in cancer therapy. *Autophagy* 2009; 5: 1232-4.
- Gisbert JP**, Nino P, Rodrigo L, Cara C, Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase (TPMT) activity and adverse effects of azathioprine in inflammatory bowel disease: long-term follow-up study of 394 patients. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 2769-76.
- Gobeil S**, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 2001; 8: 588-94.
- Goldberg SB**, Supko JG, Neal JW, Muzikansky A, Digumarthy S, Fidias P, Temel JS, Heist RS, Shaw AT, McCarthy PO, Lynch TJ, Sharma S, Settleman JE, Sequist LV. A phase I study of Erlotinib and hydroxychloroquine in advanced non-small-cell lung cancer. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1602-8.
- Gong K**, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2012; 287: 35576-88.

- Gozuacik D**, Kimchi A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 2004; 23: 2891-906.
- Greten TF**. Is there a rationale for immunomodulation?. *EASL Special Conference, Hepatocellular carcinoma: from genomics to treatment. Dubrovnik, Croacia* 2010.
- Groen KA**. Primary and metastatic liver cancer. *Semin Oncol Nurs* 1999; 15: 48-57.
- Guertin DA**, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol Med* 2005; 11: 353-61.
- Hanahan D**, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
- Hartmann W**, Waha A, Koch A, Goodyer CG, Albrecht S, von Schweinitz D, Pietsch T. p57(KIP2) is not mutated in hepatoblastoma but shows increased transcriptional activity in a comparative analysis of the three imprinted genes p57(KIP2), IGF2, and H19. *Am J Pathol* 2000, 157:1393-1403.
- Haruta T**, Uno T, Kawahara J, Takano A, Egawa K, Sharma PM, Olefsky JM, Kobayashi M. A rapamycin-sensitive pathway down-regulates insulin signaling via phosphorylation and proteasomal degradation of insulin receptor substrate-1. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 783-94.
- Hawwa AF**, Millership JS, Collier PS, Vandebroek K, McCarthy A, Dempsey S, Cairns C, Collins J, Rodgers C, McElnay JC. Pharmacogenomic studies of the anticancer and immunosuppressive thiopurines mercaptopurine and azathioprine. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 66: 517-28.
- Hayflick L**. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
- Hematulin A**, Sagan D, Eckardt-Schupp F, Moertl S. NBS1 is required for IGF-1 induced cellular proliferation through the Ras/Raf/MEK/ERK cascade. *Cell Signal* 2008; 20: 2276-85.
- Herbig U**, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 2004; 14: 501-13.
- Hippo Y**, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, Tokita S, Iwanari H, Ito Y, Nakano K, Nezu J, Tsunoda H, Yoshino T, Ohizumi I, Tsuchiya M, Ohnishi S, Makuuchi M, Hamakubo T, Kodama T, Aburatani H. Identification

- of soluble NH<sub>2</sub>-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 2418-23.
- Hitomi J**, Christofferson DE, Ng A, Yao J, Degterev A, Xavier RJ, Yuan J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. *Cell* 2008; 135:1311-23.
- HSDB** (Hazardous Substances Database), 2003 <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB> National Library of Medicine.
- Huang H**, Tindall DJ. Dynamic FoxO transcription factors. *J Cell Sci* 2007; 120: 2479-87.
- Huang J**, Manning BD. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans* 2009; 37: 217-22.
- IARC** 1981. Some Antineoplastic and Immunosuppressive Agents. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, vol. 26. France. 411 pp.
- IARC Working Group**. (2011). Azathioprine. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Vol 100 (337-349), Lyon: World Health Organization International Agency for Research on Cancer.
- Iwazawa J**, Ohue S, Mitani T, Abe H, Hashimoto N, Hamuro M, Nakamura K. Identifying feeding arteries during TACE of hepatic tumors: comparison of C-arm CT and digital subtraction angiography. *AJR Am J Roentgenol* 2009; 192: 1057-63.
- Jackson WT**, Giddings TH, Jr., Taylor MP, Mulinyawe S, Rabinovitch M, Kopito RR, Kirkegaard K. Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* 2005; 3: e156.
- Jemal A**, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2011; 61(2): 69-90.
- Ji Y**, Zhu X, Sun H, Tan Y, Ma Z, Ye Q, Sujie A, Tang Z. Hepatocellular adenoma and focal nodular hyperplasia: a series of 24 patients with clinicopathological and radiological correlation. *Chin Med J (Engl)* 2000; 113: 852-7.
- Julien LA**, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-Activated S6K1 Phosphorylates Rictor on Threonine 1135 and Regulates mTORC2 Signaling. *Mol Cell Biol* 2010; 30: 908-21.



- Kan Z**, Sato M, Ivancev K, Uchida B, Hedgpeth P, Lunderquist A, Rosch J, Yamada R. Distribution and effect of iodized poppyseed oil in the liver after hepatic artery embolization: experimental study in several animal species. *Radiology* 1993; 186: 861-6.
- Kanematsu S**, Uehara N, Miki H, Yoshizawa K, Kawanaka A, Yuri T, Subura T. Autophagy inhibition enhances sulforaphane-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2010; 30: 3381-90.
- Karran P**, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 24-36.
- Kawaguchi T**, Miyazawa K, Moriya S, Ohtomo T, Che X, Naito M, Itoh M, Tomoda A. Combined treatment with bortezomib plus bafilomycin A1 enhances the cytotoxic effect and induces endoplasmic reticulum stress in U266 myeloma cells: Crosstalk among proteasome, autophagy-lysosome and ER stress. *Int J Oncol* 2011; 38: 643-654.
- Kim BJ**, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 21256-65.
- Kim SR**, Kudo M, Hino O, Han KH, Chung YH, Lee HS. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in Japan and Korea. A review. *Oncology* 2008; 75 Suppl 1: 13-6.
- Kim T**, Kim DY, Kim KM, Seo JJ, Park KM, Lee YJ, Lee SG. Pediatric liver transplantation for hepatoblastoma: a single center experience. *Transplant Proc* 2012; 44: 523-5.
- Kim TR**, Lee HM, Lee SY, Kim EJ, Kim KC, Paik SG, Cho EW, Kim IG. SM22 $\alpha$ -induced activation of p16INK4a/retinoblastoma pathway promotes cellular senescence caused by a subclinical dose of  $\gamma$ -radiation and doxorubicin in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 400: 100-5.
- Kim SY**, Toretsky J, Scher D, Helman LJ. The role of IGF-1R in pediatric malignancies. *Oncologist* 2009; 14: 83-91
- Klener P, Jr.**, Andera L, Klener P, Necas E, Zivny J. Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways. *Folia Biol (Praha)* 2006; 52: 34-44.



- Klionsky DJ.** Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931-7.
- Kornmann M,** Maruyama H, Bergmann U, Tangvoranuntakul P, Beger HG, White MF, Korc M. Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 4250-4.
- Kowdley KV.** Iron, hemochromatosis, and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 127: S79-S86.
- Krinsky GA,** Lee VS, Theise ND, Weinreb JC, Rofsky NM, Diflo T, Teperman LW. Hepatocellular carcinoma and dysplastic nodules in patients with cirrhosis: prospective diagnosis with MR imaging and explantation correlation. *Radiology* 2001; 219: 445-54.
- Kurmasheva RT,** Houghton PJ. IGF-I mediated survival pathways in normal and malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1766: 1-22.
- Lammas DA,** Casanova JL, Kumararatne DS. Clinical consequences of defects in the IL-12-dependent interferon-gamma (IFN-gamma) pathway. *Clin Exp Immunol* 2000; 121: 417-25.
- Lammer J,** Malagari K, Vogl T, Pilleul F, Denys A, Watkinson A, Pitton M, Sergent G, Pfammatter T, Terraz S, Benhamou Y, Avajon Y, Gruenberger T, Pomoni M, Langenberger H, Schuchmann M, Dumortier J, Mueller C, Chevallier P, Lencioni R. Prospective randomized study of doxorubicin-eluting-bead embolization in the treatment of hepatocellular carcinoma: results of the PRECISION V study. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2010; 33: 41-52.
- Lavan BE,** Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem* 1997; 272: 21403-7.
- Lau WY.** Primary liver tumors. *Semin Surg Oncol* 2000; 19: 135-44.
- Leake R.** The cell cycle and regulation of cancer cell growth. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 784: 252-62.
- Lee AU,** Farrell GC. Mechanism of azathioprine-induced injury to hepatocytes: roles of glutathione depletion and mitochondrial injury. *J Hepatol* 2001; 35: 756-64.
- Lee WM.** Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.

- Lencioni R**, Cioni D, Crocetti L, Franchini C, Pina CD, Lera J, Bartolozzi C. Early-stage hepatocellular carcinoma in patients with cirrhosis: long-term results of percutaneous image-guided radiofrequency ablation. *Radiology* 2005; 234: 961-7.
- Lepreux S**, Laurent C, Balabaud C, Bioulac-Sage P. FNH-like nodules: Possible precursor lesions in patients with focal nodular hyperplasia (FNH). *Comp Hepatol* 2003; 2: 7.
- LeRoith D**, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett* 2003; 195: 127-37.
- Levine B**, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.
- Li F**, Wang L, Burgess RJ, Weinshilboum RM. Thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: autophagy as a mechanism for variant allozyme degradation. *Pharmacogenet Genomics* 2008; 18: 1083-94.
- Li JP**, Chu JP, Yang JY, Chen W, Wang Y, Huang YH. Preoperative transcatheter selective arterial chemoembolization in treatment of unresectable hepatoblastoma in infants and children. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2008; 31: 1117-23.
- Li LY**, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001; 412: 95-9.
- Liebman HA**, Furie BC, Tong MJ, Blanchard RA, Lo KJ, Lee SD, Coleman MS, Furie B. Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 1984; 310: 1427-31.
- Ling YH**, Nelson JA, Cheng YC, Anderson RS, Beattie KL. 2'-Deoxy-6-thioguanosine 5'-triphosphate as a substrate for purified human DNA polymerases and calf thymus terminal deoxynucleotidyltransferase in vitro. *Mol Pharmacol* 1991; 40: 508-14.
- Litten JB**, Tomlinson GE. Liver tumors in children. *Oncologist* 2008; 13: 812-20.
- Llovet JM**, Bru C, Bruix J. Prognosis of hepatocellular carcinoma: the BCLC staging classification. *Semin Liver Dis* 1999; 19: 329-38.
- Llovet JM**, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003; 362: 1907-17.
- (A) Llovet JM**, Bruix J. Molecular targeted therapies in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 48: 1312-27.

- (B) Llovet JM**, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J, Gores GJ. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2008; 100: 698-711.
- (C) Llovet JM**, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 2008; 359: 378-90.
- Llovet JM**. How can molecular profiling improve diagnosis and therapy in hepatocellular carcinoma. *Postgraduate course Liver tumours, 44<sup>TH</sup> EASL International Liver Congress* 2009. 46-48.
- Lodish H**, Berk B, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J. (2005). *Biología celular y molecular*. 5ªEd. (p 855), Buenos Aires: Editorial médica panamericana.
- Lu DS**, Yu NC, Raman SS, Lassman C, Tong MJ, Britten C, Durazo F, Saab S, Han S, Finn R, Hiatt JR, Busuttil RW. Percutaneous radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma as a bridge to liver transplantation. *Hepatology* 2005; 41: 1130-7.
- Lutterbach B**, Zeng Q, Davis LJ, Hatch H, Hang G, Kohl NE, Gibbs JB, Pan BS. Lung cancer cell lines harboring MET gene amplification are dependent on Met for growth and survival. *Cancer Res* 2007; 67: 2081-8.
- Ma L**, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis. *Cell* 2005; 121: 179-93.
- Macheiner D**, Heller G, Kappel S, Bichler C, Stattner S, Ziegler B, Kandioler D, Wrba F, Schulte-Hermann R, Zochbauer-Muller S, Grasl-Kraupp B. NORE1B, a candidate tumor suppressor, is epigenetically silenced in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2006; 45: 81-9.
- Maeda H**, Hori S, Ohizumi H, Segawa T, Kakehi Y, Ogawa O, Kakizuka A. Effective treatment of advanced solid tumors by the combination of arsenic trioxide and L-buthionine-sulfoximine. *Cell Death Differ* 2004; 11: 737-46.

- Makin E**, Davenport M. Fetal and neonatal liver tumours. *Early Hum Dev* 2010; 86: 637-42.
- Malagari K**, Pomoni M, Spyridopoulos TN, Moschouris H, Kelekis A, Dourakis S, Alexopoulou E, Koskinas J, Angelopoulos M, Kornezos J, Pomoni A, Tandeles S, Marinis A, Rizos S, Kelekis D. Safety profile of sequential transcatheter chemoembolization with DC Bead: results of 237 hepatocellular carcinoma (HCC) patients. *Cardiovasc Intervent Radiol* 2011; 34: 774-785.
- Malogolowkin MH**, Katzenstein HM, Krailo M, Chen Z, Quinn JJ, Reynolds M, Ortega JA. Redefining the role of doxorubicin for the treatment of children with hepatoblastoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2379-83.
- Mann JR**, Kasthuri N, Raafat F, Pincott JR, Parkes SE, Muir KR, Ingram LC, Cameron AH. Malignant hepatic tumours in children: incidence, clinical features and aetiology. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1990; 4: 276-89.
- Marrero JA**, Fontana RJ, Barrat A, Askari F, Conjeevaram HS, Su GL, Lok AS. Prognosis of hepatocellular carcinoma: comparison of 7 staging systems in an American cohort. *Hepatology* 2005; 41: 707-16.
- Marrero JA**, Su GL, Wei W, Emick D, Conjeevaram HS, Fontana RJ, Lok AS. Des-gamma carboxyprothrombin can differentiate hepatocellular carcinoma from nonmalignant chronic liver disease in american patients. *Hepatology* 2003; 37: 1114-21.
- Mathew R**, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 961-7.
- Matsuo M**, Kanematsu M, Inaba Y, Matsueda K, Yamagami T, Kondo H, Arai Y, Hoshi H. Pre-operative detection of malignant hepatic tumours: value of combined helical CT during arterial portography and biphasic CT during hepatic arteriography. *Clin Radiol* 2001; 56: 138-45.
- Matsuzaki H**, Daitoku H, Hatta M, Tanaka K, Fukamizu A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11285-90.
- Mazzaferro V**, Regalia E, Doci R, Andreola S, Pulvirenti A, Bozzetti F, Montalto F, Ammatuna M, Morabito A, Gennari L. Liver transplantation for the treatment of

- small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 1996; 334: 693-9.
- McConnell BB**, Starborg M, Brookes S, Peters G. Inhibitors of cyclin-dependent kinases induce features of replicative senescence in early passage human diploid fibroblasts. *Curr Biol* 1998; 8: 351-4.
- Melo A**, Monteiro L, Lima RM, Oliveira DM, Cerqueira MD, El-Bachá RS. Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev* 2011; 2011: 467180.
- Menor C**, Fernandez-Moreno MD, Fueyo JA, Escribano O, Olleros T, Arriaza E, Cara C, Lorusso M, Di Paola M, Roman ID, Guijarro LG. Azathioprine acts upon rat hepatocyte mitochondria and stress-activated protein kinases leading to necrosis: protective role of N-acetyl-L-cysteine. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 311: 668-76.
- Menor C**, Fueyo J, Escribano O, Pina MJ, Redondo P, Cara C, Roman ID, Fernandez-Moreno MD, Guijarro LG. Thiopurine methyltransferase activity in a Spanish population sample: decrease of enzymatic activity in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2002; 8: 243-8.
- Moore T**, Checkley LA, Digiovanni J. Dietary energy balance modulation of epithelial carcinogenesis: a role for IGF-1 receptor signaling and crosstalk. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1229: 7-17.
- Nakakuma K**, Tashiro S, Hiraoka T, Uemura K, Konno T, Miyauchi Y, Yokoyama I. Studies on anticancer treatment with an oily anticancer drug injected into the ligated feeding hepatic artery for liver cancer. *Cancer* 1983; 52: 2193-200.
- Namur J**, Citron SJ, Sellers MT, Dupuis MH, Wassef M, Manfait M, Laurent A. Embolization of hepatocellular carcinoma with drug-eluting beads: Doxorubicin tissue concentration and distribution in patient liver explants. *J Hepatol* 2011; 55: 1132-8.
- Neshiwat LF**, Friedland ML, Schorr-Lesnick B, Feldman S, Glucksman WJ, Russo RD Jr. Hepatic angiosarcoma. *Am J Med* 1992; 93: 219-22.
- Neuschwander-Tetri BA**, Caldwell SH. Nonalcoholic steatohepatitis: summary of an AASLD Single Topic Conference. *Hepatology* 2003; 37: 1202-19.

- Nishiyama M**, Wands JR. Cloning and increased expression of an insulin receptor substrate-1-like gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 183: 280-5.
- Nordenstedt H**, White DL, El-Serag HB. The changing pattern of epidemiology in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42 Suppl 3: S206-14.
- Okayasu I**, Hatakeyama S, Yoshida T, Yoshimatsu S, Tsuruta K, Miyamoto H, Kimura Y. Selective and persistent deposition and gradual drainage of iodized oil, Lipiodol in the hepatocellular carcinoma after injection into the feeding hepatic artery. *Am J Clin Pathol* 1988; 90: 536-44.
- Okuda K**, Ohtsuki T, Obata H, Tomimatsu M, Okazaki N, Hasegawa H, Nakajima Y, Ohnishi K. Natural history of hepatocellular carcinoma and prognosis in relation to treatment. Study of 850 patients. *Cancer* 1985; 56: 918-28.
- Okusaka T**, Kasugai H, Shioyama Y, Tanaka K, Kudo M, Saisho H, Osaki Y, Sata M, Fujiyama S, Kumada T, Sato K, Yamamoto S, Hinotsu S, Sato T. Transarterial chemotherapy alone versus transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: a randomized phase III trial. *J Hepatol* 2009; 51: 1030-6.
- Omata M**, Tateishi R, Yoshida H, Shiina S. Treatment of hepatocellular carcinoma by percutaneous tumor ablation methods: Ethanol injection therapy and radiofrequency ablation. *Gastroenterology* 2004; 127: S159-66.
- Omenetti A**, Choi S, Michelotti G, Diehl AM. Hedgehog signaling in the liver. *J Hepatol* 2011; 54: 366-73.
- Otto G**, Herber S, Heise M, Lohse AW, Monch C, Bittinger F, Hoppe-Lotichius M, Schuchmann M, Victor A, Pitton M. Response to transarterial chemoembolization as a biological selection criterion for liver transplantation in hepatocellular carcinoma. *Liver Transpl* 2006; 12: 1260-7.
- Parfitt K**. (1999). *The complete drug reference (Martindale)*. London: PhP(pharmaceutical press).
- Park SH**, Lim JS, Jang KL. All-trans retinoic acid induces cellular senescence via upregulation of p16, p21, and p27. *Cancer Lett* 2011; 310: 232-9.
- Parkin DM**. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 2006; 118: 3030-44.

- Parkin DM**, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
- Patschan S**, Chen J, Polotskaia A, Mendeleev N, Cheng J, Patschan D, Goligorsky MS. Lipid mediators of autophagy in stress-induced premature senescence of endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:1119-29.
- Peterson MS**, Baron RL. Radiologic diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 123-44.
- Petit E**, Langouet S, Akhdar H, Nicolas-Nicolaz C, Guillouzo A, Morel F. Differential toxic effects of azathioprine, 6-mercaptopurine and 6-thioguanine on human hepatocytes. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 632-42.
- Pieters R**. Acute lymphoblastic leukaemia in children and adolescents: chance of cure now higher than 80%. *Ned Tijdschr Geneesk* 2010; 154: A1577.
- Pollak MN**, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 505-18.
- Pradelli LA**, Beneteau M, Ricci JE. Mitochondrial control of caspase-dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci* 2010; 67: 1589-97.
- Puthalakath H**, Villunger A, O'Reilly LA, Beaumont JG, Coultas L, Cheney RE, Huang DC, Strasser A. Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis. *Science* 2001; 293:1829-32.
- Rathmell JC**, Thompson CB. Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 2002; 109 Suppl: S97-107.
- Rautou PE**, Mansouri A, Lebrech D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. *J Hepatol* 2010; 53: 1123-34.
- Ribons LA**, Slovis TL. Hepatoblastoma and birth weight. *J pediatr* 1998; 132: 750.
- Ricci MS**, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist* 2006; 11: 342-57.
- Rodier F**, Campisi J. Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol.* 2011; 192: 547-56.
- Rogler G**. Gastrointestinal and liver adverse effects of drugs used for treating IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2010; 24: 157-65.
- Rosich Moya L**, Bosch Lonch F. (2007). Gertrude Belle Elion: lucha y modestia en un nuevo entorno de investigación farmacológica, en González-Duarte R. Doce



mujeres en la biomedicina del siglo XX. Cuadernos de formación del Dr. Antonio Esteve nº13 (13-28), Barcelona: Fundación Dr. Antonio Esteve.

- Sabatini DM.** mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 729-34.
- Sachdev D,** Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancer therapy. *Mol Cancer Ther* 2007; 6: 1-12.
- Salazar M,** Carracedo A, Salanueva IJ, Hernandez-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vazquez P, Blazquez C, Torres S, Garcia S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, Gonzalez-Feria L, Iovanna JL, Guzman M, Boya P, Velasco G. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 1359-72.
- Sandborn WJ.** Azathioprine: state of the art in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998; 225: 92-9.
- Sandhu DS,** Roberts LR. Diagnosis and management of cholangiocarcinoma. *Curr Gastroenterol Rep* 2008; 10: 43-52.
- Sanz J.** (2005). *Vademecum internacional* (2006-2007), Madrid: CMP Medicom Editorial S.A.
- Sarbassov DD,** Ali SM, Kim DH, Guertin DA, Latek RR, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini DM. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* 2004; 14: 1296-302.
- Sarbassov DD,** Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 2005; 307: 1098-101.
- Sarbassov DD,** Ali SM, Sengupta S, Sheen JH, Hsu PP, Bagley AF, Markhard AL, Sabatini DM. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly and Akt/PKB. *Mol Cell* 2006; 22: 159-68.
- Sayre LM,** Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 172-88.
- Schoenborn JR,** Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 2007; 96: 41-101.
- Sengupta A,** Molkenin JD, Yutzey KE. FoxO Transcription factors promote autophagy in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2009; 284: 28319-31.



- Shah OJ**, Hunter T. Turnover of the active fraction of IRS1 involves Raptor-mTOR- and S6K1-Dependent Serine Phosphorylation in cell culture models of tuberous sclerosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 6425-34.
- Shaw RJ**, Cantley LC. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 2006; 441: 424-30.
- Sherlock S**. The spectrum of hepatotoxicity due to drugs. *The Lancet* 1986; 2: 440-4.
- Sherr CJ**. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-7.
- Shimizu M**, Shirakami Y, Sakai H, Tatebe H, Nakagawa T, Hara Y, Weinstein IB, Moriwaki H. EGCG inhibits activation of the insulin-like growth factor (IGF)/IGF-1 receptor axis in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett* 2008; 262: 10-8.
- Shin E**, Lee KB, Park SY, Kim SH, Ryu HS, Park YN, Yu E, Jang JJ. Gene expression profiling of human hepatoblastoma using archived formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 2011; 458: 453-65.
- Shin SW**. The current practice of transarterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Korean J Radiol* 2009; 10: 425-34.
- Shiraki K**, Takase K, Tameda Y, Hamada M, Kosaka Y, Nakano T. A clinical study of lectin-reactive alpha-fetoprotein as an early indicator of hepatocellular carcinoma in the follow-up of cirrhotic patients. *Hepatology* 1995; 22: 802-7.
- Sicklick JK**, Li YX, Jayaraman A, Kannangai R, Qi Y, Vivekanandan P, Ludlow JW, Owzar K, Chen W, Torbenson MS, Diehl AM. Dysregulation of the Hedgehog pathway in human hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 2006; 27: 748-57.
- Sivaprakasam P**, Gupta AA, Greenberg ML, Capra M, Nathan PC. Survival and long-term outcomes in children with hepatoblastoma treated with continuous infusion of cisplatin and doxorubicin. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011; 33: 226-30.
- Snow JL**, Gibson LE. The role of genetic variation in thiopurine methyltransferase activity and the efficacy and/or side effects of azathioprine therapy in dermatologic patients. *Arch Dermatol* 1995; 131: 193-7.
- Steuerman R**, Shevah O, Laron Z. Congenital IGF1 deficiency tends to confer protection against post-natal development of malignancies. *Eur J Endocrinol* 2011; 164: 485-9.

- Stuver SO**, Kuper H, Tzonou A, Lagiou P, Spanos E, Hsieh CC, Mantzoros C, Trichopoulos D. Insulin-like growth factor 1 in hepatocellular carcinoma and metastatic liver cancer in men. *Int J Cancer* 2000; 87: 118-21.
- Sun XJ**, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, Cahill DA, Goldstein BJ, White MF. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature* 1991; 352: 73-7.
- Susin SA**, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.
- Swann PF**, Waters TR, Moulton DC, Xu YZ, Zheng Q, Edwards M, Mace R. Role of postreplicative DNA mismatch repair in the cytotoxic action of thioguanine. *Science* 1996; 273: 1109-11.
- Takayama H**, LaRochelle WJ, Sharp R, Otsuka T, Kriebel P, Anver M, Aaronson SA, Merlino G. Diverse tumorigenesis associated with aberrant development in mice overexpressing hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 701-6.
- Takigawa Y**, Brown AM. Wnt signaling in liver cancer. *Curr Drug Targets* 2008; 9: 1013-24.
- Tamemoto H**, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994; 372: 182-6.
- (A) Tanaka S**, Wands JR. Insulin receptor substrate 1 overexpression in human hepatocellular carcinoma cells prevents transforming growth factor beta1-induced apoptosis. *Cancer Res* 1996; 56: 3391-4.
- (B) Tanaka S**, Wands JR. A carboxy-terminal truncated insulin receptor substrate-1 dominant negative protein reverses the human hepatocellular carcinoma malignant phenotype. *J Clin Invest* 1996; 98: 2100-8.
- Taniguchi CM**, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7: 85-96.

- Tapner MJ**, Jones BE, Wu WM, Farrell GC. Toxicity of low dose azathioprine and 6-mercaptopurine in rat hepatocytes. Roles of xanthine oxidase and mitochondrial injury. *J Hepatol* 2004; 40: 454-63.
- Tay BS**, Lilley RM, Murray AW, Atkinson MR. Inhibition of phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase from Ehrlich ascites-tumour cells by thiopurine nucleotides. *Biochem Pharmacol* 1969; 18: 936-8.
- The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators**. A new prognostic system for hepatocellular carcinoma: a retrospective study of 435 patients: the Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) investigators. *Hepatology* 1998; 28: 751-5.
- The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators**. Prospective validation of the CLIP score: a new prognostic system for patients with cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The Cancer of the Liver Italian Program (CLIP) Investigators. *Hepatology* 2000; 31: 840-5.
- Tiede I**, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, Lehr HA, Wirtz S, Becker C, Atreya R, Mudter J, Hildner K, Bartsch B, Holtmann M, Blumberg R, Walczak H, Iven H, Galle PR, Ahmadian MR, Neurath MF. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest* 2003; 111: 1133-45.
- Tomlinson GE**, Finegold M. (2002). Tumors of the liver. *Principles and practice of pediatric oncology* (847-64), Philadelphia: Williams and Wilkins.
- Tooze SA**, Yoshimori T. The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 831-5.
- Tovar V**, Alsinet C, Villanueva A, Hoshida Y, Chiang DY, Sole M, Thung S, Moyano S, Toffanin S, Minguez B, Cabellos L, Peix J, Schwartz M, Mazzaferro V, Bruix J, Llovet JM. IGF activation in a molecular subclass of hepatocellular carcinoma and pre-clinical efficacy of IGF-1R blockage. *J Hepatol* 2010; 52: 550-9.
- Townsend DM**, Manevich Y, He L, Hutchens S, Pazoles CJ, Tew KD. Novel role for glutathione S-transferase pi. Regulator of protein S-Glutathionylation following oxidative and nitrosative stress. *J Biol Chem* 2009; 284: 436-45.
- Vahrmeijer AL**, van Dierendonck JH, Schutrups J, van de Velde CJ, Mulder GJ. Potentiation of the cytostatic effect of melphalan on colorectal cancer hepatic

- metastases by infusion of buthionine sulfoximine (BSO) in the rat: enhanced tumor glutathione depletion by infusion of BSO in the hepatic artery. *Cancer Chemother Pharmacol* 1999; 44: 111-6.
- Van Malenstein H**, Van Pelt J, Verslype C. Molecular classification of hepatocellular carcinoma anno 2011. *Eur J Cancer* 2011; 47: 1789-97.
- Vandenabeele P**, Galluzzi L, Vanden Berghe T, Kroemer G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 700-14.
- Vergel M**, Marin JJ, Estevez P, Carnero A. Cellular Senescence as a Target in Cancer Control. *J Aging Res* 2010; 30: 725365.
- Vernier-Massouille G**, Cosnes J, Lemann M, Marteau P, Reinisch W, Laharie D, Cadiot G, Bouhnik Y, De Vos M, Boureille A, Duclos B, Seksik P, Mary JY, Colombel JF. Nodular regenerative hyperplasia in patients with inflammatory bowel disease treated with azathioprine. *Gut* 2007; 56: 1404-9.
- Vogelstein B**, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10: 789-99.
- Wang J**, Whiteman MW, Lian H, Wang G, Singh A, Huang D, Denmark T. A non-canonical MEK/ERK signaling pathway regulates autophagy via regulating Beclin 1. *J Biol Chem* 2009; 284: 21412-24.
- Wang XW**, Hussain SP, Huo TI, Wu CG, Forgues M, Hofseth LJ, Brechot C, Harris CC. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Toxicology* 2002; 181-182: 43-7.
- Warmann SW**, Fuchs J, Bitzer M, Lauer UM. Emerging gene-directed anti-tumor strategies against human hepatoblastoma. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 1155-61.
- Weinshilboum RM**, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet* 1980; 32: 651-62.
- White E**, Lowe SW. Eating to exit: autophagy-enabled senescence revealed. *Genes Dev* 2009; 23: 784-7.
- White MF**. IRS proteins and the common path to diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283: E413-22.

- White MF**, Maron R, Kahn CR. Insulin rapidly stimulates tyrosine phosphorylation of a Mr-185,000 protein in intact cells. *Nature* 1985; 318: 183-6.
- Wilhelm S**, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, Schwartz B, Simantov R, Kelley S. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 835-44.
- Withers DJ**, Gutierrez JS, Towery H, Burks DJ, Ren JM, Previs S, Zhang Y, Bernal D, Pons S, Shulman GI, Bonner-Weir S, White MF. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 1998; 391: 900-4.
- Wörns MA**, Galle PR. Future perspectives in hepatocellular carcinoma. *Dig Liver Dis* 2010; 42 Suppl 3: S302-9.
- Wu MJ**, Chang CH, Chiu YT, Wen MC, Shu KH, Li JR, Chiu KY, Chen YT. Rictor-dependent AKT activation and inhibition of urothelial carcinoma by rapamycin. *Urol Oncol* 2012; 30: 69-77.
- Wullschleger S**, Loewith R, Hall MN. TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 2006; 124: 471-84.
- Xie Z**, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1102-9.
- Xing C**, Zhu B, Liu H, Yao H, Zhang L. Class I phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY294002 activates autophagy and induces apoptosis through p53 pathway in gastric cancer cell line SGC7901. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008; 40: 194-201.
- Xu C**, Shen G, Yuan X, Kim J, Gopalkrishnan A, Keum Y, Nair S, Kong AT. ERK and JNK signaling pathways are involved in the regulation of activator protein 1 and cell death elicited by three isothiocyanates in human prostate cancer PC-3 cells. *Carcinogenesis* 2006; 27: 437-45.
- Yan T**, Berry SE, Desai AB, Kinsella TJ. DNA mismatch repair (MMR) mediates 6-thioguanine genotoxicity by introducing single-strand breaks to signal a G2-M arrest in MMR-proficient RKO cells. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2327-34.
- Yang Z**, Klionsky DJ. An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 335: 1-32.

- Yang ZJ**, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1533-41.
- Ye J**, Shu Q, Li M, Jiang TA. Percutaneous radiofrequency ablation for treatment of hepatoblastoma recurrence. *Pediatr Radiol* 2008; 38:1021-3.
- Yin Z**, Fan L, Huang G, Wang H, Wang Z. The possible role of ribosomal protein S6 kinase 4 in the senescence of endothelial progenitor cells in diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2012; 11:12.
- Yoshida F**, Yamamoto T, Nakai K, Kumada H, Shibata Y, Tsuruta W, Endo K, Tsurubuchi T, Matsumura A. Combined use of sodium borocaptate and buthionine sulfoximine in boron neutron capture therapy enhanced tissue boron uptake and delayed tumor growth in a rat subcutaneous tumor model. *Cancer Lett* 2008; 263: 253-8.
- Yoshida H**, Yoshida H, Shiina S, Omata M. Early liver cancer: concepts, diagnosis, and management. *Int J Clin Oncol* 2005; 10: 384-90.
- Young ARJ**, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavares S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 2009; 23: 798-803.
- Yu MC**, Yuan JM, Lu SC. Alcohol, cofactors and the genetics of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23: S92-S7.
- Yu MW**, Chang HC, Chang SC, Liaw YF, Lin SM, Liu CJ, Lee SD, Lin CL, Chen PJ, Lin SC, Chen CJ. Role of reproductive factors in hepatocellular carcinoma: Impact on hepatitis B- and C-related risk. *Hepatology* 2003; 38: 1393-400.
- Zabirnyk O**, Yezhelyev M, Seleverstov O. Nanoparticles as a novel class of autophagy activators. *Autophagy* 2007; 3: 278-81.
- Zekry A**, Gleeson M, Guney S, McCaughan GW. A prospective cross-over study comparing the effect of mycophenolate versus azathioprine on allograft function and viral load in liver transplant recipients with recurrent chronic HCV infection. *Liver Transpl* 2004; 10: 52-7.
- Zeng X**, Yan T, Schupp JE, Seo Y, Kinsella TJ. DNA mismatch repair initiates 6-thioguanine-induced autophagy through p53 activation in human tumor cells. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 1315-21.

**Zeng X**, Kinsella TJ. Mammalian target of rapamycin and S6 kinase 1 positively regulate 6-thioguanine-induced autophagy. *Cancer Res* 2008; 68: 2384-90.

**Zhang YJ**, Chen Y, Ahsan H, Lunn RM, Chen SY, Lee PH, Chen CJ, Santella RM. Silencing of glutathione S-transferase P1 by promoter hypermethylation and its relationship to environmental chemical carcinogens in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 2005; 221: 135-43.





