

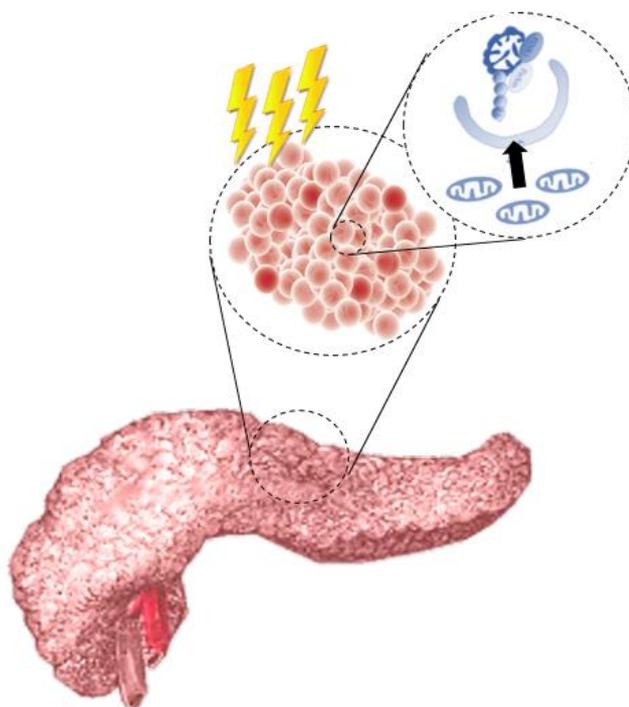


TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Biología Molecular y Biotecnología

Universidad de Murcia

LA MITOFAGIA COMO UN MECANISMO DE RESISTENCIA
DE LAS CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS A LA
RADIOTERAPIA



Pilar María Poyatos Romera

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular A

Curso 2018-2019

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- OBJETIVOS.....	2
3.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3.1.- Materiales.....	3
3.2.- Cultivos celulares.....	3
3.3.- Western Blot.....	3
3.4.- Microscopía óptica confocal.....	3
3.5.- Microscopía óptica de contraste de fases.....	3
3.6.- Microscopía electrónica de transmisión.....	3
3.7.- Tinción de Hoechst.....	4
3.8.- Ensayo de viabilidad celular MTT.....	4
3.9.- Tinción de Cristal Violeta.....	4
3.10.- Determinación de la actividad de la enzima luciferasa.....	4
3.11.- Ensayo de apoptosis mediante técnica ELISA.....	4
3.12.- RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).....	4
3.13.- Análisis estadístico.....	4
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
4.1.- Las células de cáncer de páncreas son adictas a la autofagia.....	5
4.2.- Las células de cáncer de páncreas son resistentes a la radioterapia.....	6
4.3.- La radiación ionizante induce mitofagia en las células de cáncer de páncreas.....	6
4.4.- La mitofagia asociada a excitosis como un mecanismo de defensa del cáncer de páncreas a la radioterapia.....	8
5.- CONCLUSIONES.....	9
6.- BIBLIOGRAFÍA.....	9
7.- AGRADECIMIENTOS.....	10
ANEXO I. Anticuerpos primarios empleados en Western Blot.....	11
ANEXO II. <i>Primers</i> utilizados en la qPCR y condiciones de la RT.....	11
ANEXO III. Tareas concretas realizadas dentro de la investigación.....	11
ANEXO IV. Asignaturas cursadas.....	11
ANEXO V. Declaración de originalidad.....	12

RESUMEN

El cáncer de páncreas presenta una de las mayores tasas de mortalidad entre todos los tipos de cáncer. Su alta resistencia a terapias convencionales como la radioterapia, constituye uno de los principales motivos de su letalidad. Sin embargo, los mecanismos exactos que confieren esa resistencia no han sido aún elucidados. El objetivo de este trabajo es profundizar en las vías que crean resistencia a la radiación ionizante (IR) en las células de cáncer de páncreas. Concretamente, se pretende analizar el papel de la autofagia y la mitofagia tras la IR y su interrelación con otros sistemas. Para ello, se han llevado a cabo estudios de viabilidad celular y apoptosis, análisis de los niveles de reguladores clave de esos procesos y su visualización por microscopía. El presente estudio sugiere que el proceso de autofagia es crítico para el desarrollo y la supervivencia de este tipo celular, tanto en condiciones basales como después de exposición radiológica. A su vez, los resultados indican que la IR podría inducir mitofagia. Un estudio más exhaustivo de este mecanismo tras la radiación mostró que la mitofagia va asociada a exocitosis lisosomal, planteando que estos dos procesos son clave para la evasión del daño inducido por la radiación y la consecuente resistencia a la radioterapia. En conjunto, las evidencias obtenidas sugieren que la manipulación de la mitofagia asociada a exocitosis constituye una potencial diana terapéutica en combinación con la radioterapia para el tratamiento del cáncer de páncreas. Con ello, este trabajo plantea una posible futura dirección para la investigación del cáncer pancreático.

1.- INTRODUCCIÓN

El páncreas es la principal glándula accesoria productora de enzimas de nuestro sistema digestivo. Presenta una porción exocrina (98% de la masa total), encargada de enviar enzimas digestivas al intestino delgado y una porción endocrina (2% de la masa total) constituida por los islotes de Langerhans, que regula el metabolismo mediante la secreción de glucagón, insulina y somatostatina [1]. Una acumulación de mutaciones genéticas y alteraciones epigenéticas, junto con ciertos factores de riesgo relacionados con el estilo de vida y el ambiente pueden derivar en cáncer pancreático. Los genes más comúnmente mutados son KRAS, CDKN2A, TP53, SMAD4, PRSS1 y BRCA2, existiendo un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad al existir alteraciones en ellos [2, 3]. A su vez, estudios recientes han puesto de manifiesto el papel de la maquinaria epigenética en el desarrollo y velocidad de progresión y en la respuesta a cambios ambientales del tumor [4]. Finalmente, el tabaco, la edad, la dieta, la inactividad física o enfermedades como la obesidad, la diabetes o la pancreatitis son importantes factores de riesgo asociados al cáncer pancreático [2, 3].

El cáncer de páncreas es uno de los tipos de cáncer con mayor tasa de mortalidad en el mundo. El ratio mortalidad/incidencia asciende al 98% y el ratio global de 5 años de supervivencia es inferior al 7% [2]. Actualmente, es la cuarta causa de muerte por cáncer en países desarrollados y se estima que llegará a ser la segunda en la próxima década [3]. En España ya está considerada la tercera causa, con una estimación de 7765 casos nuevos diagnosticados por año y 7279 fallecimientos en 2018 [5]. Se calcula que más del 95% de los casos de cáncer de páncreas se producen en la porción exocrina, específicamente en las células epiteliales del conducto pancreático principal, siendo a su vez el adenocarcinoma ductal pancreático (PDCA) el tipo más grave de cáncer de páncreas. El cáncer pancreático presenta un pronóstico muy desfavorable por diversas razones. Es frecuentemente diagnosticado en estadios tardíos, siendo la cirugía aplicable solo entre el 10-15% de los pacientes. Esto es consecuencia de la manifestación tardía de síntomas, de la ausencia de marcadores específicos y de las dificultades para obtener imágenes en etapas tempranas. A su vez, el cáncer de páncreas es altamente agresivo, con metástasis temprana y una alta resistencia a las terapias más convencionales, entre ellas, la radioterapia [3].

El tratamiento de radioterapia basa su acción en la capacidad de la radiación ionizante (IR) de producir roturas de doble cadena (DSBs; *double strand breaks*) en el ADN. Una numerosa agrupación de sitios dañados junto con la deficiente maquinaria reparadora que presentan en general las células para este tipo de roturas favorecen la eficacia de la radioterapia. Además, la alta capacidad proliferativa de las células tumorales facilita la propagación del daño con la consecuente apoptosis y muerte celular. Sin embargo, la complejidad en el comportamiento y microambiente de algunos tumores lleva a resistencia ante este tratamiento [6]. Ambas características están presentes en el cáncer de páncreas, por lo que la resistencia a la radioterapia es por múltiples vías [7, 8, 9]. Por lo tanto, profundizar en esas vías, así como encontrar mecanismos que incrementen la radiosensibilidad del cáncer de páncreas es necesario.

La complejidad de los tumores pancreáticos se refleja también en su metabolismo. Estas células tumorales exhiben altos niveles de autofagia, así como dependencia de los factores de transcripción MITF/TFE para activar el sistema autofagia-lisosoma, manteniendo así los niveles de aminoácidos intracelulares [3]. La autofagia, conservado proceso degradativo de orgánulos celulares y macromoléculas, es requerida para la patogenicidad del cáncer pancreático, y el incremento del importe nuclear de las proteínas MiT/TFE (MITF, TFE3 y TFEB) induce altos niveles de función catabólica lisosomal esencial para el crecimiento del tumor pancreático [10]. Sin embargo, existe una cierta controversia respecto al papel pro-supervivencia o pro-muerte de la autofagia en relación al cáncer [11]. Además, la necesidad del proceso de autofagia es también una característica de las células pancreáticas normales. Ha sido descrito que la autofagia es crítica para el mantenimiento de la homeostasis de las células pancreáticas acinares, funcionando como un reciclaje continuo de proteínas mal plegadas. Una pérdida de la autofagia induciría estrés del

retículo endoplasmático, promoviendo daño mitocondrial y acumulación de ROS con la consecuente pérdida de función pancreática. Este daño a su vez puede llevar al desarrollo de pancreatitis, incrementándose el riesgo de padecer cáncer pancreático [12]. Nuevos estudios deben ser desarrollados para elucidar la aparente disparidad del papel de la autofagia en relación al cáncer.

La autofagia es un proceso catabólico evolutivamente conservado. Implica la formación de una estructura de doble membrana denominada autofagosoma que se fusiona con lisosomas, dando lugar a un autolisosoma donde el contenido envuelto será degradado. En este proceso es fundamental el papel de las proteínas Atg, las cuales forman complejos que regulan la formación del autofagosoma: complejo quinasa ULK1, complejo Beclina 1-VPS34 clase III fosfoinosítido 3-quinasa (PI3K), complejo Atg9-Atg2-Atg18 y los sistemas de conjugación Atg5-Atg12-Atg16 y Atg8/LC3 [13]. Este proceso tiene importantes funciones en un amplio rango de procesos celulares como el mantenimiento de la homeostasis, adaptación a la privación de nutrientes, balance energético, inmunidad, muerte celular o degradación de orgánulos. Esta última función constituye la denominada autofagia selectiva, encargada de eliminar de forma específica orgánulos dañados o excesivos. Así, principalmente podemos encontrar pexofagia para peroxisomas, erfagia para retículo endoplásmico, ribofagia para ribosomas o mitofagia para mitocondrias [11, 13].

La mitocondria es un orgánulo esencial para la obtención de energía y regulación de la homeostasis y muerte celular, de tal forma que la mitofagia es un proceso crucial para mantener una correcta función celular [13, 14]. Diversos estudios han puesto de manifiesto el papel fundamental de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK) en este proceso, regulando la homeostasis mitocondrial. La AMPK promueve la fisión de la mitocondria, proceso requerido para que ocurra la mitofagia. De esta forma, por su implicación en la regulación de la dinámica mitocondrial se ha convertido en una potencial diana para el tratamiento de enfermedades asociadas a perturbación metabólica, como es el cáncer. Su activación ha sido relacionada con actividad antitumoral en algunos contextos por inhibir el crecimiento de las células tumorales, pero también se ha vinculado con una mejora de la supervivencia de las células cancerígenas bajo condiciones de estrés metabólico [14]. Por tanto, estudios adicionales son requeridos para esclarecer las ventajas de su activación o inactivación según las circunstancias. A su vez, la implicación de la mitofagia en la oncogénesis y especialmente en el cáncer pancreático, también permanece considerablemente desconocida y necesita futuras investigaciones.

El interés creciente por los procesos de autofagia ha llevado a que comience a comprenderse su correlación con otros procesos. Así, recientes estudios han sugerido una conexión entre autofagia y exocitosis. La exocitosis implica un transporte vesicular intracelular hacia la membrana plasmática, con la consecuente secreción del contenido vesicular. Diversas enfermedades muestran una conexión entre estos dos procesos, entre ellas, el cáncer. Una regulación alterada de autofagia y exocitosis ha sido vista en esta enfermedad, de tal forma que un exceso de exocitosis favorece la migración de las células cancerígenas metastáticas a la vez que un exceso de autofagia aporta la energía necesaria para que ocurra la exocitosis y la división celular [11]. Por otro lado, la correlación entre autofagia y el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) también ha sido estudiada. El UPS marca proteínas solubles con ubiquitina para enviarlas a degradación en el proteasoma. De esta forma, la ubiquitina constituye un nexo entre este sistema y la autofagia selectiva. Además, se ha visto que perturbaciones en uno de los procesos afecta a la actividad del otro sistema, de tal forma que un desajuste del sistema ubiquitina proteasoma deriva en un aumento de la autofagia [15]. El estudio de estas intersecciones es relevante, especialmente si se pretende manipular una de las vías con fines terapéuticos. Nuevamente, este campo permanece notablemente inexplorado en el cáncer pancreático, siendo particularmente interesante realizar futuros estudios.

2.- OBJETIVOS

EL objetivo general de este trabajo es profundizar en los mecanismos que confieren resistencia a la radioterapia en las células de cáncer de páncreas. De forma específica, los objetivos son:

- 1.- Profundizar en la relevancia del proceso de autofagia en estas células en condiciones normales.
- 2.- Evaluar el papel del sistema autofagia-lisosoma y de la mitofagia en este tipo celular tras ser sometido a IR.
- 3.- Conocer la interrelación del proceso de autofagia con otros sistemas para identificar posibles nuevas dianas terapéuticas que sensibilicen las células tumorales pancreáticas a la radioterapia.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Materiales: Medio Mínimo Esencial Dulbecco's (DMEM), colorante Hoechst 33342 y bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) fueron suministrados por Sigma. MitoTracker y LysoTracker fueron proporcionados por Thermo Fisher Scientific. MG132 fue obtenido de Abcam.

3.2.- Cultivos celulares: El mantenimiento y la manipulación de los cultivos celulares se llevó a cabo en el Servicio de Cultivo de Tejidos (SCT) de la Universidad de Murcia. La línea celular de cáncer de páncreas humano PANC1 procedente del conducto pancreático (adenocarcinoma) fue suministrada por el SCT y obtenida de la ATCC (*American Type Culture Collection*). La línea empleada estaba modificada genéticamente con el gen Luc2 para la expresión de la enzima luciferasa. Fue mantenida en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 10% de Suero Bovino Fetal (SBF), 1 mM de piruvato y 2 mM de glutamina e incubada a 37°C, 7.5% de CO₂ y 95% de humedad. Se añadió penicilina y estreptomycin al medio de cultivo a una concentración final de 50-100 UI/ml y 50-100 µg/ml, respectivamente. Las células fueron irradiadas mediante el irradiador de rayos X Andrex SMART 200E (*YSLON International*) del Servicio de Radioprotección y Residuos de la Universidad de Murcia. La intensidad de radiación aplicada fue 10 Gray (Gy).

3.3.- Western Blot: Para la preparación de extractos proteicos se retiró el medio de cultivo de las células y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS). Seguidamente, las células fueron lisadas y recogidas con tampón de muestra desnaturante (Tris-HCl 125 mM, glicerol 10%, SDS 2%, β-mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01%). A continuación, las muestras se sonicaron y se les aplicó un tratamiento térmico de desnaturación de 5 min a 95°C. Las proteínas de las muestras fueron separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida al 12.5%. Para la transferencia se emplearon membranas de nitrocelulosa. Una vez bloqueadas con leche desnatada, las membranas se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario y 2 horas con el secundario. Tras cada incubación se hicieron 3 lavados con solución salina tamponada con Tris y Tween-20 (TBS-Tween) para eliminar el anticuerpo no unido. Los anticuerpos primarios utilizados en los ensayos se detallan en el **Anexo I**. Se emplearon anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa. La actividad peroxidasa fue revelada mediante el sistema *ECL Plus* de GE Healthcare, detectada con el dispositivo de análisis de imagen *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* de BioRad y analizada con su software *Lab Imager*.

3.4.- Microscopía óptica confocal: Las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de cristal en una placa Petri. Para el procesamiento, se retiró el medio de cultivo y se hicieron 2 lavados con PBS. A continuación, las células fueron fijadas a temperatura ambiente durante 5 min con acetona fría (4°C). Se retiró el fijador y se efectuaron 3 lavados con PBS frío. Las uniones inespecíficas se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA) al 3% en PBS durante 1 hora. Tras la incubación se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS y las células se incubaron en una cámara húmeda con los anticuerpos primarios y secundarios, realizando varios lavados tras estas incubaciones. Los anticuerpos secundarios, conjugados con fluoróforo, fueron un anticuerpo anti-IgG de ratón producido en cabra, Alexa Fluor 488 (Invitrogen) que emite en verde y un anticuerpo anti-IgG de conejo producido en cabra, Alexa Fluor 633 (también de Invitrogen) que emite en la zona roja del espectro electromagnético. Por otro lado, se hizo uso de las sondas fluorescentes MitoTracker y LysoTracker para la visualización de orgánulos específicos. Cada cubreobjetos fue montado en un portaobjetos con 30 µl de *Prolong Gold Antifade* que incluye DAPI en el medio de montaje (Invitrogen). El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente que tiñe el ADN de azul y se utiliza en los casos en que se requiere la tinción de los núcleos celulares. Las preparaciones fueron visualizadas en el microscopio confocal Leica TCS-SP2 de la Sección de Microscopía y analizadas mediante el software que este incorpora.

3.5.- Microscopía óptica de contraste de fases: La microscopía de contraste de fases se empleó de forma rutinaria para la observación de los cultivos celulares. Se realizó en un microscopio óptico invertido Nikon-Eclipse TE-2000 del SCT, tomándose fotografías con una cámara acoplada para estudiar la morfología celular de los cultivos.

3.6.- Microscopía electrónica de transmisión: Las células fueron sometidas al procesamiento convencional de microscopía electrónica de transmisión en la Sección de Microscopía. Primero, las muestras fueron centrifugadas 10 min a 1500 rpm. A continuación, se llevó a cabo la fijación con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0.1 M, incubándose las muestras 1 hora a 4°C. Tras ello, se centrifugaron, se quitó el fijador y las muestras se dejaron toda la noche a 4°C en tampón cacodilato 0.1 M con sacarosa al 8%. Después de volver a centrifugar, se quitó el tampón y se pusieron las muestras durante 2 horas y 30 min a 4°C en tetraóxido de osmio al 1%. Seguidamente, se centrifugaron, se eliminó el tetraóxido y se volvieron a poner en tampón cacodilato 0.1 M y sacarosa al 8%. A continuación, las muestras se deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes (30 a 100%), se lavaron con óxido de propileno y se incluyeron en resina epoxi (EPON). Finalmente, las muestras se cortaron en secciones ultrafinas con ultramicrotomo y se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Las preparaciones fueron visualizadas en el microscopio electrónico de transmisión JEOL 1011 y se tomaron fotografías con una cámara digital acoplada de alto contraste GATAN ORIUS SC200 de la Sección de Microscopía.

3.7.- Tinción de Hoechst: Las células fueron teñidas con el método de Hoechst. El Hoechst es un colorante fluorescente que se intercala en el ADN y lo tiñe de azul. Esta capacidad nos permite utilizarlo para estudiar el estado de condensación de la cromatina. Posee un máximo de absorción a una longitud de onda de 350 nm y un máximo de emisión a 461 nm. Para llevar a cabo la tinción, se retiró el medio de cultivo y a cada pocillo se le adicionó 1 ml de medio fresco y 1 ml de fijador de Carnoy (metanol/ácido acético en proporción 3/1 v/v). Se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y se retiró la mezcla. Nuevamente, 1 ml de fijador de Carnoy fue añadido y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se retiró el fijador y se dejó secar el cultivo. Se adicionaron 2 ml del colorante Hoechst 33342 (10 µg/ml en PBS) y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Se retiró el colorante y las muestras se visualizaron en el microscopio óptico invertido Nikon-Eclipse TE-2000 del SCT usando el filtro UV-2B, que es el indicado para la excitación del Hoechst. Se tomaron varias fotografías de cada muestra en distintos campos y a diferentes aumentos.

3.8.- Ensayo de viabilidad celular MTT: Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima succinato deshidrogenasa de células metabólicamente activas de convertir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) en formazano, de color azul intenso e insoluble en agua. La cantidad de formazano es directamente proporcional al número de células. Para el ensayo, se retiró el medio de cultivo de placas de 96 pocillos y a cada pocillo se le adicionaron 0.2 ml de medio fresco. A continuación, se añadieron 50 µl de la disolución de MTT (5 mg/ml disuelto en medio de cultivo) y se incubó en oscuridad durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio con el MTT y se añadieron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilizar el formazano formado. La absorbancia fue medida a 570 nm en un espectrofotómetro, empleándose 690 nm como longitud de onda de referencia.

3.9.- Tinción de Cristal Violeta: Esta tinción permite conocer la viabilidad celular, mostrando el potencial proliferativo de una población celular. Para llevarla a cabo, se retiró el medio de cultivo de placas de 12 pocillos y se añadió 1 ml de metanol por pocillo. Transcurridos 20 min de incubación a temperatura ambiente, se retiró el metanol y se lavaron los pocillos con 1 ml de agua destilada. Tras retirar el agua, se adicionaron 500 µl de colorante Cristal Violeta por pocillo y se incubó la placa 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó con agua destilada para retirar el exceso de colorante y se dejó secar.

3.10.- Determinación de la actividad de la enzima luciferasa: La línea celular de estudio PANC1-Luc2 expresaba de forma constitutiva el gen de la enzima luciferasa, emitiendo luz tras ser expuesta al sustrato (luciferina) a una tasa aproximada de 450 fotones/segundo/célula. La luciferina se adicionó a una concentración de 150 µg/ml, dejándose incubar durante 10 min. La visualización se llevó a cabo en el equipo *In Vivo Imaging System* (IVIS) (Caliper Sciences).

3.11.- Ensayo de apoptosis mediante técnica ELISA: La apoptosis fue analizada utilizando un ensayo ELISA diseñado por la compañía Roche. Una de las principales características de la apoptosis es la fragmentación del ADN, dando lugar a fragmentos ADN mono- y oligo-nucleosomales. Este método se basa en la detección de nucleosomas apoptóticos presentes en la fracción citoplasmática de un lisado celular. Para llevarlo a cabo, primero se centrifugó la placa para retirar el sobrenadante con los restos celulares de células necróticas. A continuación, se adicionaron 200 µl de tampón de lisis y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Tras centrifugar de nuevo 10 min, se transfirieron 20 µl de cada pocillo a los pocillos de una placa ELISA. Seguidamente, se adicionaron 80 µl por pocillo del reactivo con anticuerpos anti-histona-biotina y anti-ADN-peroxidasa y se incubó en agitación durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras retirar el sobrenadante y lavar 3 veces cada pocillo, se adicionó la solución ABTS y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de placas. Para el cálculo del factor de enriquecimiento citosólico nucleosomal se dividió la media de la absorbancia de cada muestra entre un pocillo control teniendo en cuenta el número de células que se tomaron inicialmente para la lisis.

3.12.- RT-PCR Cuantitativa (RT-qPCR): La evaluación de cambios en la expresión de distintos genes fue llevada a cabo con RT-qPCR. El ARN total celular fue extraído mediante el kit NZY de aislamiento del ARN total (Nzytech) y la cantidad y calidad del ARN fue analizada con un Nanodrop. Las condiciones utilizadas para la retrotranscripción se indican en el **Anexo II**. Para llevar a cabo el análisis por qPCR, se utilizó una dilución 1/50 de las muestras de cDNA y se empleó la actina como gen de referencia. En una placa de 96 pocillos se adicionaron 8 µl de la muestra de cDNA diluida, 2 µl de los *primers* (**Anexo II**) y 10 µl de SYBR Green (fluorocromo) por pocillo, poniéndose cada muestra por triplicado. La amplificación se realizó con la Taq ADN polimerasa *Hot Start* y el programa de amplificación consistió en una etapa de calentamiento inicial a 95°C (10 min) seguido de 50 ciclos de amplificación a 62°C (1 min). Terminada la amplificación, siguieron una serie de etapas (95°C durante 15 seg, 60°C durante 1 min y 95°C durante 15 seg) para conseguir la curva de desnaturalización del ADN extendido. El experimento se realizó en el equipo 7500 *Real Time PCR System* de *Applied Biosystems* en la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. La cuantificación relativa se llevó a cabo con el método de C_T comparativo, evaluándose la diferencia entre la actina y el gen de estudio.

3.13.- Análisis estadístico: Los resultados experimentales recogidos en este trabajo se expresan como la media \pm la desviación estándar (DE). Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado de forma independiente. Para la

comparación de datos con distribución normal se aplicó el test paramétrico *t* de Student, considerándose una diferencia significativa entre grupos cuando $P < 0.05$.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Las células de cáncer de páncreas son adictas a la autofagia: Estudios en nuestro laboratorio y otros [10, 16, 17] han mostrado que las células de cáncer de páncreas requieren un elevado nivel de autofagia para su crecimiento y desarrollo. Cuando la línea PANC1 fue cultivada a una densidad de 1000 células/mm² en condiciones normales de cultivo, estas sufrieron una transformación fenotípica dependiente del tiempo con un evidente aumento de vesículas redondas y homogéneas ocupando gran parte del citosol (**Fig. 1A**). El posible origen de esta transformación se estudió a partir de experimentos de Western Blot y microscopía confocal. El análisis de varios marcadores de autofagia indicó la activación dependiente del tiempo de LC3-II (implicado en la formación del autofagosoma) y p-AMPK (regulador de la autofagia) (**Fig. 1C**). De acuerdo con la activación de p-AMPK, se observó además un aumento de los genes reguladores maestros de la autofagia MITF, TFEB y TFE3 (**Fig. 1E**) y la translocación nuclear de MITF (**Fig. 1D**). Estos resultados sugieren un origen autofágico de las vacuolas observadas en la **Fig. 1A**. Además, las células PANC1 transformadas mostraron mitocondrias más alargadas, signo evidente del proceso de fisión mitocondrial previo a una autofagia selectiva (**Fig. 1B**). Estas evidencias indican que las células de cáncer de páncreas son dependientes del proceso de autofagia y que bajo condiciones limitantes de nutrientes, son capaces de activar los sistemas necesarios para abastecerse de nutrientes celulares. Un mecanismo que recoge la adaptación metabólica de las células de cáncer de páncreas para sobrevivir en condiciones de estrés metabólico se describe en la **Fig. 1F**.

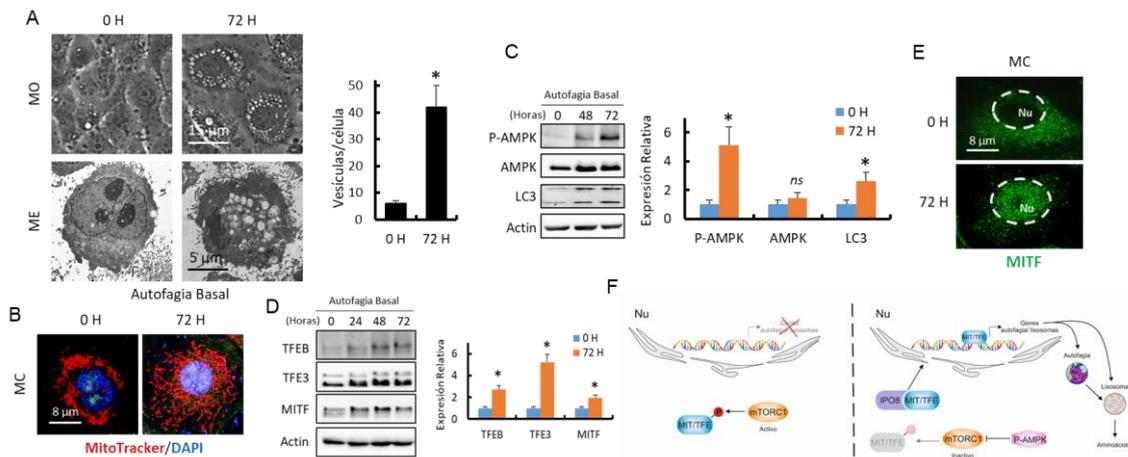


Figura 1. Las células de cáncer de páncreas son adictas a la autofagia. (A) El aumento del número de vesículas en células PANC1 en condiciones normales fue observado con microscopía óptica (MO; arriba) y microscopía electrónica (ME; abajo). El histograma muestra el análisis estadístico del número de vesículas por célula determinado por el conteo de vesículas en más de 20 células por condición. * $P < 0.05$ respecto al control a 0 H. (B) Visualización de la morfología mitocondrial a distintos tiempos con microscopía confocal (MC). (C y D) Los niveles de p-AMPK, AMPK, LC3, TFEB, TFE3 y MITF fueron estudiados mediante análisis por Western Blot a diferentes tiempos. El histograma muestra la expresión relativa respecto a β -actina. * $P < 0.05$ al comparar con la expresión a 0 H. (E) Visualización de la localización intracelular de MITF mediante MC. (F) Modelo esquemático del mecanismo molecular de activación del proceso de autofagia. En respuesta a privación de nutrientes, p-AMPK inhibe a mTORC1, evitando la fosforilación de los factores Mit/TFE y permitiendo su traslocación al núcleo con IPO8 (importina). Mit/TFE inducen la transcripción de genes del sistema autofagia-lisosoma, dando lugar a la obtención de aminoácidos a través de este proceso.

La autofagia tiene lugar tanto en condiciones fisiológicas como patológicas, constituyendo una respuesta protectora de las células frente a estrés metabólico. Su rol pro-supervivencia ha sido ampliamente estudiado, sin embargo, existe una alta controversia sobre su papel exacto en la progresión de células cancerígenas. Los primeros estudios que demostraron una relación entre autofagia y cáncer plantearon que la autofagia podía actuar como un mecanismo de supresión del tumor. Existen evidencias que sugieren que durante el inicio del proceso de oncogénesis la autofagia actúa como un proceso protector de la transformación maligna, manteniendo la estabilidad genómica y limitando la iniciación y progresión en determinados tumores. Sin embargo, estudios emergentes indican que el papel protector de la autofagia también puede servir para incrementar la supervivencia y desarrollo de células cancerígenas [18]. Este hecho pone de manifiesto la importancia de analizar el papel de la autofagia en cada tipo de cáncer.

La necesidad de este proceso para la supervivencia de las células tumorales pancreáticas mostrada en nuestros resultados sugiere que el bloqueo de este sistema puede ser una opción efectiva para el tratamiento de este tipo de cáncer. Además, estudios que muestran una correlación entre una mayor expresión de proteínas como LC3 y un peor pronóstico de esta enfermedad apoyan estos datos [19]. Así, los componentes moleculares implicados en la regulación

de la autofagia se convierten en potenciales dianas terapéuticas. Sin embargo, este mecanismo debe ser estudiado con mayor detalle para minimizar posibles efectos secundarios y poder obtener una óptima eficacia terapéutica.

4.2.- Las células de cáncer de páncreas son resistentes a la radioterapia: La radioterapia es una importante intervención terapéutica empleada en el tratamiento de muchos tipos de tumores como terapia primaria, adyuvante o neoadyuvante. Sin embargo, la recurrencia local después de la radiación sigue siendo un obstáculo para su uso. Se ha podido comprobar que las células de cáncer de páncreas son relativamente refractarias al daño al ADN inducido por IR y, por lo tanto, a la apoptosis. La irradiación de las células PANC1 a una intensidad de 10 Gy no resultó en cambios apreciables respecto a la densidad celular cuando se observaron al microscopio óptico (**Fig. 2A**). La línea PANC1 estudiada estaba modificada genéticamente para expresar constitutivamente la enzima luciferasa, una proteína *reporter* que permite determinar el número de células. Por ello, la densidad de células sometidas a IR también se estudió a través de la determinación de la actividad luciferasa. Estos resultados, así como los obtenidos mediante la tinción de Cristal Violeta, reflejaron nuevamente la ausencia de cambios en la densidad celular (**Fig. 2B**). Finalmente, el estudio de la apoptosis tras IR mediante tinción de Hoechst y ensayo por técnica ELISA mostraron una ausencia de núcleos condensados y de cuerpos apoptóticos en la **Fig. 2C** y de ADN fragmentado en la **Fig. 2D**, reflejando la capacidad de las células tumorales pancreáticas para escapar al daño que produciría la IR. Todos esos resultados sugerían la inexistencia de un efecto en este tipo celular tras ser sometido a radiación. Sin embargo, una observación a mayor aumento de las células irradiadas mostró una disminución del número de vesículas autofágicas por célula (**Fig. 2A**) así como grandes acúmulos de material oscuro predominantemente en el exterior celular.

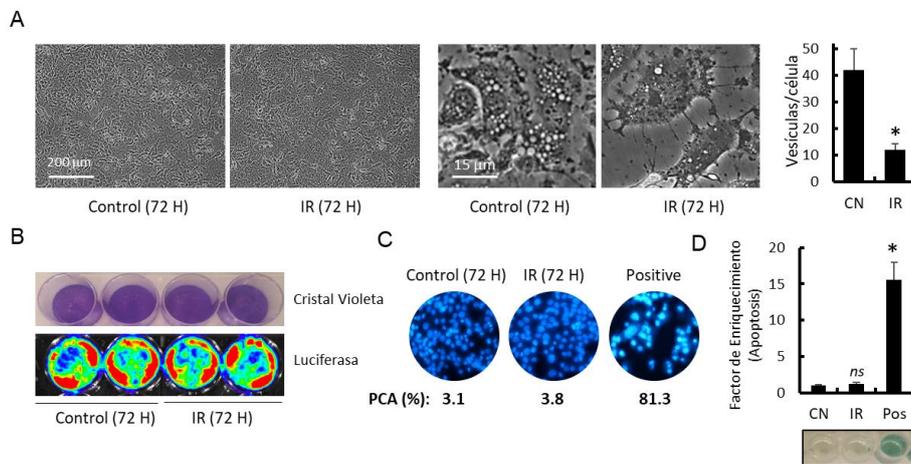


Figura 2. Las células de cáncer de páncreas son resistentes a la radioterapia. (A) Visualización de la densidad celular de PANC1 en condiciones normales (control) y tras IR mediante MO. La variación en el número de vesículas fue también observada en células control e irradiadas. El histograma muestra el análisis estadístico del número de vesículas por célula. * $P < 0.05$ respecto al control (CN). (B) La densidad celular en células control e irradiadas fue analizada con tinción de Cristal Violeta (arriba) y determinación de la actividad luciferasa (abajo). (C y D) La apoptosis fue analizada en células control e irradiadas utilizando la tinción de Hoechst (C) y el ensayo de apoptosis mediante técnica ELISA de Roche (D). En ambos casos, como control positivo de apoptosis (Pos) se utilizaron células PANC1 tratadas con el inhibidor del proteasoma MG132 (5 μ M; 48 H). PCA, porcentaje de células apoptóticas. El histograma representa el análisis estadístico del nivel de apoptosis determinado con la técnica ELISA en cada condición. * $P < 0.05$ cuando se compara con el control (CN).

Dado que uno de los grandes retos para el tratamiento del cáncer de páncreas es su resistencia a terapias convencionales como la radioterapia, los mecanismos que promueven esta resistencia están siendo explorados. Cada vez resulta más evidente la importancia de la autofagia en la eficacia de las terapias contra el cáncer. Diversos estudios han mostrado una alteración de la autofagia, incrementándose los niveles de este proceso en células tumorales irradiadas [18]. Sin embargo, los mecanismos subyacentes al papel de la autofagia como vía protectora frente a terapias que inducen estrés en cáncer pancreático aún deben ser elucidados. La disminución observada en el número de vesículas autofágicas tras aplicar IR con respecto a células tumorales pancreáticas control llevó a que se profundizara en este proceso. Los resultados son objeto de análisis en los siguientes apartados.

4.3.- La radiación ionizante induce mitofagia en las células de cáncer de páncreas: Ensayos de alto rendimiento basados en la viabilidad metabólica, como el MTT y el MTS, se utilizan ampliamente para evaluar la viabilidad celular. La capacidad de la enzima succinato deshidrogenasa presente en las mitocondrias para transformar esos compuestos en formazano, soluble y medible espectrofotométricamente, es lo que determina la cantidad de células metabólicamente activas (**Fig. 3A**). Sin embargo, la alteración tanto en el contenido mitocondrial como en el metabolismo puede influir en la viabilidad metabólica de las células, limitando la aplicación de este ensayo. A su vez, es conocido que en otros tipos de cáncer la radiación es un potencial inductor de la biogénesis mitocondrial [20]. Por

lo tanto, se comprobó si el ensayo MTT era una medida verdadera de la viabilidad celular tras aplicar IR en las células PANC1. Los resultados obtenidos a distintos tiempos mostraron que los valores de viabilidad calculados eran menores que los que correspondían al número de células observadas con la tinción de Cristal Violeta y la determinación de la actividad luciferasa del apartado anterior (Fig. 3A). Estos hallazgos sugerían que la radiación disminuía de alguna forma el número de mitocondrias o su actividad respiratoria, conduciendo a una menor viabilidad metabólica y reducción de los valores obtenidos con MTT. A su vez, mostraban que las conclusiones que se podrían extraer sobre inhibición de crecimiento inducida por radiación basadas en estos ensayos serían erróneas.

Análisis de proteínas por Western Blot indicaron que tras la irradiación, las células PANC1 seguían manteniendo un alto nivel de autofagia, caracterizado por la activación de proteínas relacionadas con este proceso. Así, se observó un aumento de p-AMPK, LC3, MITF, TFE3 y TFEB (Fig. 3B). Sin embargo, ensayos de microscopía confocal revelaron un cambio significativo en cuanto a la forma de las mitocondrias y una considerable interacción entre mitocondrias y LC3, siendo esta una de las primeras manifestaciones del proceso de mitofagia para la eliminación de mitocondrias (Fig. 3C). Es conocida la participación de p-AMPK en el proceso de mitofagia. Su actividad es capaz de activar proteínas mediante fosforilación, resultando en la degradación lisosomal de las mitocondrias [14]. Entre esas proteínas destacan: Mff (proteína de la membrana mitocondrial externa que se une a Drp1 GTPasa y promueve la fisión mitocondrial); PGC1 α (coactivador transcripcional que regula los genes involucrados en el metabolismo energético y la biogénesis de mitocondrias); ULK1 (proteína necesaria en los primeros pasos de la biogénesis del autofagosoma); y SIRT1 (enzima desacetilasa que contribuye a la regulación de la autofagia) (Fig. 3D). Con el fin de conocer los mecanismos que conducen a mitofagia tras la exposición de las células PANC1 a la radiación, se estudió la expresión de estas proteínas por Western Blot y RT-qPCR. Como se observa en la Fig. 3E, la IR indujo un aumento en los niveles de mRNA de Mff, PGC1 α y SIRT1, así como un aumento de la proteína PGC1 α y la fosforilación de ULK1 dependiente de p-AMPK. Estos datos apoyan un mecanismo por el cual la IR activa la biogénesis de mitocondrias pero a su vez, induce la fisión de estas y su posterior degradación por mitofagia (Fig. 3F).

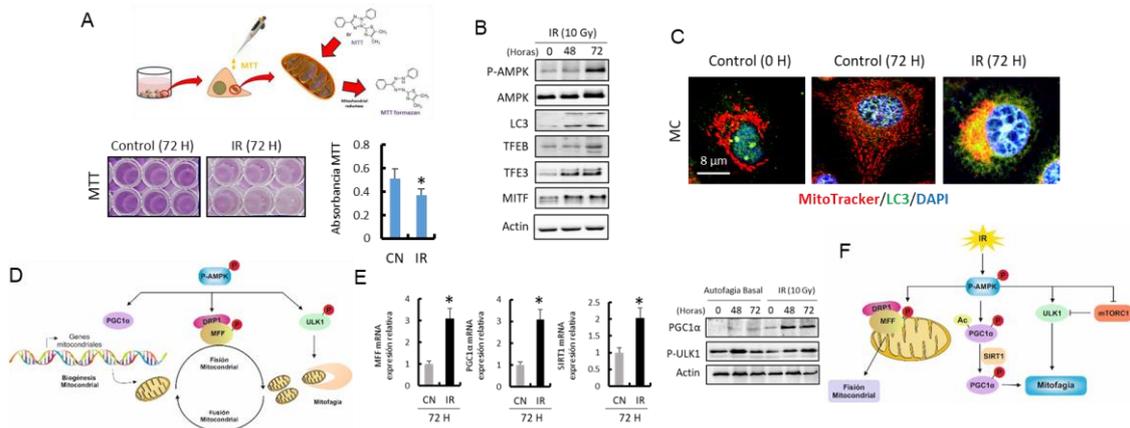


Figura 3. La radiación ionizante induce mitofagia en células de cáncer de páncreas. (A) Modelo esquemático del ensayo de viabilidad celular MTT (arriba). Este ensayo fue llevado a cabo en células PANC1 control e irradiadas (abajo). El histograma muestra el análisis estadístico de la absorbancia. * $P < 0.05$ respecto al control (CN). (B) Los niveles de p-AMPK, AMPK, LC3, TFE3, TFE3 y MITF en células PANC1 fueron estudiados mediante Western Blot a distintos tiempos tras la irradiación. La actina fue empleada como control de carga. (C) La morfología mitocondrial y la localización intracelular de LC3 y mitocondrias fueron visualizadas con MC en células control e irradiadas. (D) Esquema representativo de la regulación de la homeostasis mitocondrial por AMPK. AMPK activada fosforila a MFF, regulando así la fisión mitocondrial a través de DRP1, y a ULK1, desencadenando el proceso de mitofagia. En periodos de estrés energético AMPK activa a PGC1 α , induciendo la expresión de genes mitocondriales y dando lugar a la biogénesis de mitocondrias. (E) Izquierda, la expresión relativa de mRNA de MFF, PGC1 α y SIRT1 fue analizada mediante RT-qPCR. Los histogramas muestran el análisis estadístico de los niveles de expresión en condiciones normales (CN) e irradiadas (IR). * $P < 0.05$ respecto al control. Derecha, Western Blot de los niveles de PGC1 α y p-ULK1 en células en las condiciones indicadas. La actina fue empleada como control de carga. (F) Esquema propuesto de la regulación mitocondrial por AMPK tras la IR. La radiación induce un aumento de la biogénesis de mitocondrias pero a su vez, provoca fisión mitocondrial y una posterior degradación por mitofagia.

Existe una cierta controversia sobre el papel de la mitofagia en la biología del cáncer. Este proceso era considerado como supresor del desarrollo tumoral, previniendo la transformación oncogénica. Sin embargo, diferentes estudios han mostrado que la mitofagia promueve la oncogénesis y la supervivencia de las células tumorales en varios tipos de cáncer. Dado que la efectividad de las terapias convencionales contra el cáncer reside en la inducción de disfunción mitocondrial con el consecuente aumento de ROS y muerte por apoptosis, la mitofagia ha sido estudiada como posible mecanismo mediador de esa resistencia. Sin embargo, los hallazgos de diversos estudios han revelado que también existe un rol dual de la mitofagia en relación a la resistencia ante estrés inducido por terapias anticancerígenas. De esta forma, la inducción de muerte o supervivencia en células tumorales por la mitofagia depende del tipo de tumor y

del tratamiento aplicado [21]. Nuestros resultados sugieren que en las células de cáncer de páncreas la mitofagia es un proceso pro-supervivencia ante la IR. Con ello, una inhibición de este proceso en combinación con radioterapia podría tener un efecto sinérgico en el tratamiento del cáncer de páncreas, incrementándose la citotoxicidad.

4.4.- La mitofagia asociada a exocitosis como un mecanismo de defensa del cáncer de páncreas a la radioterapia: El posible potencial terapéutico de la mitofagia para incrementar la sensibilidad de las células tumorales pancreáticas a la radioterapia llevó a que se profundizara en este mecanismo tras la exposición radiológica. Diversos estudios han mostrado que un exceso del proceso de mitofagia puede derivar en muerte celular [21], por lo tanto, entender cómo las células de cáncer de páncreas sobreviven a pesar de los elevados niveles de mitofagia tras la IR fue objeto de estudio.

Aunque las células de cáncer de páncreas irradiadas presentaban un considerable aumento del proceso de autofagia tras la exposición radiológica, una disminución significativa del número de vacuolas autofágicas tras la irradiación fue visualizada (**Fig. 2A**). Mediante microscopía confocal se observó que durante la autofagia basal en las células PANC1, los lisosomas colocalizaban con la proteína LC3 y estos complejos (autolisosomas) se localizaban en el citosol celular (**Fig. 4A**), probablemente cumpliendo la función de abastecer a las células de nutrientes necesarios para su crecimiento y división. Sin embargo, tras la radiación los complejos formados por lisosomas y LC3 se localizaron mayoritariamente en la periferia celular (**Fig. 4A**). La visualización con microscopía electrónica también mostró un aumento de vesículas autofágicas en la periferia celular tras la radiación, así como una exportación de estas vesículas (**Fig. 4B**). Es conocido que el daño mitocondrial y el estrés del retículo endoplasmático (ER) resultan en una acumulación de ROS [12, 21]. Por su parte, el estrés del ER estimula la eliminación de vesículas asociadas a los lisosomas. Este proceso es conocido como exocitosis lisosomal, está mediado por Ca^{+2} y en él se ha implicado a la proteína TFEB [22].

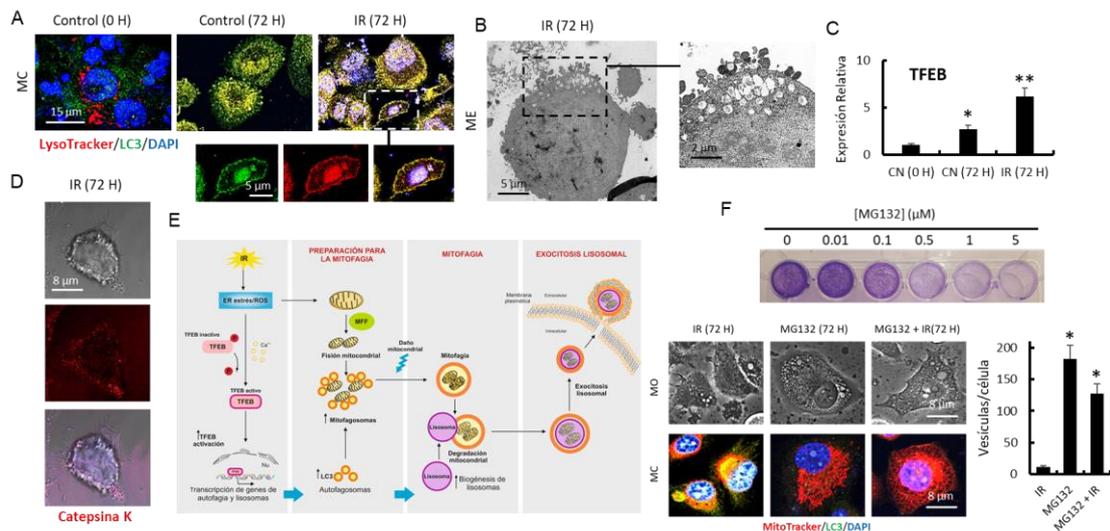


Figura 4. La mitofagia asociada a exocitosis como un mecanismo de defensa del cáncer de páncreas a la radioterapia. (A) Visualización de la localización intracelular de los complejos formados por lisosomas y LC3 mediante MC. (B) Las vesículas autofágicas fueron también visualizadas en células irradiadas mediante ME. (C) La expresión relativa de TFEB (obtenida de ensayos de Western Blot tras normalizar frente a su correspondiente β -actina) queda representada en el histograma. * $P < 0.05$ respecto al control a 0 H y ** $P < 0.05$ respecto al control a 72 H. (D) Visualización de la localización intracelular de la cathepsina K en células irradiadas con MC. (E) Esquema representativo de la mitofagia asociada a exocitosis inducida por la IR. La IR promueve estrés del retículo endoplasmático (ER estrés) y liberación de ROS. Este daño induce la activación de TFEB, con la consecuente transcripción de genes de autofagia y lisosomas, y fisión mitocondrial, previa al proceso de mitofagia. Los mitofagosomas se unen a lisosomas para la degradación de las mitocondrias, siendo este autolisosoma expulsado de la célula por exocitosis lisosomal. (F) Arriba, visualización de la densidad celular con la tinción de Cristal Violeta en células tratadas con MG132 (inhibidor del proteasoma). Abajo, la presencia de vesículas y la localización intracelular de LC3 y mitocondrias fue observada con MO y MC, respectivamente. Las células fueron tratadas con MG132 (5 μ M) o irradiadas en ausencia o presencia de MG132 (5 μ M). El histograma muestra el análisis estadístico del número de vesículas por célula en las distintas condiciones ensayadas. * $P < 0.05$ respecto a las células sometidas exclusivamente a IR.

Dado que la IR incrementaba considerablemente los niveles de TFEB en las células de cáncer de páncreas (**Fig. 4C**), se comprobó si la radiación inducía exocitosis lisosomal. Para ello, se estudió mediante microscopía confocal la localización de la cathepsina K, una proteasa exclusivamente intra-lisosomal. Como se observa en la **Fig. 4D**, la IR indujo la localización periférica de la cathepsina K, existiendo vesículas exocíticas repletas de esta proteína. Por lo tanto, todos estos resultados apoyan un mecanismo por el cual, la radiación induce mitofagia asociada a exocitosis

lisosomal como se representa en la **Fig. 4E**. Este mecanismo podría explicar la resistencia de las células de cáncer de páncreas a la radioterapia. La liberación descontrolada de catepsinas en el citosol de las células da lugar a un proceso conocido como apoptosis asociada a los lisosomas [23]. La eliminación de lisosomas y mitocondrias mediante el proceso de mitofagia asociada a exocitosis lisosomal mantendría fuera de las células a aquellos desencadenantes de la apoptosis y constituiría un mecanismo de defensa de las células de cáncer de páncreas a la IR.

La importancia de elucidar este mecanismo de resistencia radica en poder buscar estrategias para lograr evadirlo. En principio, y tras la IR, se podría especular que inhibir aquellos procesos que llevan a la mitofagia y/o a la exocitosis lisosomal podrían incrementar la sensibilidad de las células de cáncer de páncreas a la radiación. Recientemente, se ha indicado que los inhibidores del proteasoma, como MG132, sensibilizan las células de cáncer de páncreas a IR [24]. Aunque el mecanismo concreto que lleva a esta sinergia no ha sido estudiado, cada día resulta más evidente el papel del UPS en la autofagia. Así, muchas proteínas mitocondriales son ubiquitinizadas durante el proceso de mitofagia [15, 25]. Para comprobar si la inhibición del proteasoma era capaz de interferir en el mecanismo de defensa de las células de cáncer de páncreas a la IR, se trataron las células PANC1 con MG132. Como se observa en la **Fig. 4F**, la inhibición del proteasoma redujo significativamente el número de células tumorales de una forma dependiente de la concentración. También se comprobó que la inhibición del proteasoma era capaz de reducir la mitofagia inducida por la IR (**Fig. 4F**), no existiendo colocalización entre mitocondrias y LC3. Esto podría explicar los efectos antitumorales sinérgicos de la radiación y el inhibidor del proteasoma en el tratamiento de las células de cáncer de páncreas [24].

Todos estos resultados confirman que la mitofagia es un mecanismo prioritario para la defensa de las células de cáncer de páncreas a la IR. A su vez, indica que una combinación terapéutica basada en quimioterapia (con inhibidores del proteasoma) y radioterapia podría ser de utilidad, desde un punto de vista clínico, en pacientes con este tipo de neoplasia. Este descubrimiento se plantea como una prometedora estrategia que debe ser explorada y testada para verificar su potencial terapéutico.

5.- CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que se pueden extraer de este trabajo son las siguientes:

- Las células de cáncer de páncreas son dependientes del proceso de autofagia, actuando como un sistema protector frente a estrés por limitación de nutrientes. Este papel pro-supervivencia de la autofagia en células tumorales plantea la manipulación de este proceso como posible diana terapéutica. Estudios más exhaustivos son necesarios para comprender los mecanismos moleculares que regulan este proceso y poder optimizar futuros tratamientos.
- Las células de cáncer de páncreas son resistentes a la radioterapia, lo que evita su muerte por apoptosis tras la IR. Esta característica pone de manifiesto la agresividad y complejidad de este tipo de células tumorales y enfatiza la urgente necesidad de elucidar los mecanismos exactos que dan lugar a esa resistencia.
- La IR induce mitofagia asociada a exocitosis en células de cáncer de páncreas. La implicación de estas vías en la resistencia de las células tumorales pancreáticas a la radioterapia hace que estos procesos se conviertan en una potencial diana terapéutica.
- La conexión del proceso de autofagia con otros sistemas celulares también podría crear nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento del cáncer de páncreas. La intersección entre el UPS y la mitofagia podría explicar el efecto sinérgico antitumoral observado tras la administración de radioterapia en presencia de un inhibidor del UPS.

6.- BIBLIOGRAFÍA

1. Longnecker D. 2014. Anatomy and histology of the pancreas. *Pancrapedia: Exocrine Pancreas Knowledge Base*. doi: 10.3998/panc.2014.3
2. Ilic M & Ilic I. 2016. Epidemiology of pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology* 22: 9694-9705. doi: 10.3748/wjg.v22.i44.9694
3. Kleeff J, Korc M, Apte M, La Vecchia C, Johnson CD, Biankin AV, Neale RE, Tempero M, Tuveson DA, Hruban RH & Neoptolemos JP. 2016. Pancreatic cancer. *Nature Reviews. Disease Primers* 2: 16022. doi: 10.1038/nrdp.2016.22
4. Paradise BD, Barham W & Fernández-Zapico ME. 2018. Targeting epigenetic aberrations in pancreatic cancer, a new path to improve patient outcomes? *Cancers* 10: 128. doi: 10.3390/cancers10050128
5. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) 2018. Los avances en cáncer de páncreas. Disponible en <https://seom.org/los-avances-en-cancer-de-pancreas> (accedido el 2 de junio de 2019).
6. Lomax ME, Folkes LK & O'Neill P. 2013. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance

- to radiotherapy. *Clinical Oncology* 25: 578-585. doi: 10.1016/j.clon.2013.06.007
7. Nagajaru GP, Zakka KM, Landry JC, Shaib WL, Lesinski G & El-Rayes BF. 2019. Inhibition of HSP90 overcomes resistance to chemotherapy and radiotherapy in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.32227
 8. Hidalgo M. 2010. Pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine* 362: 1607-1615. doi: 10.1056/NEJMra0901557
 9. Colak S & Medema JP. 2014. Cancer stem cells – important players in tumor therapy resistance. *FEBS Journal* 281: 4779-4791. doi: 10.1111/febs.13023
 10. Perera RM, Stoykova S, Nicolay BN, Ross KN, Fitamant J, Boukhail M, Lengrend J, Deshpande V, Selig MK, Ferrone CR, Settleman J, Stephanopoulos G, Dyson NJ, Zoncu R, Ramaswamy S, Haas W & Bardeesy N. 2015. Transcriptional control of autophagy-lysosome function drives pancreatic cancer metabolism. *Nature* 524: 361-365. doi: 10.1038/nature14587
 11. Brooks DA, Bader C, Ng YS, Brooks RD, Borlace GN & Shandala T. 2012. At the intersection of the pathways for exocytosis and autophagy. *Crosstalk and Integration of Membrane Trafficking Pathways* 110-136. doi: 10.5772/39111
 12. Antonucci L, Fagman JB, Kim JY, Todoric J, Gukovsky I, Mackey M, Ellisman MH & Karin M. 2015. Basal autophagy maintains pancreatic acinar cell homeostasis and protein synthesis and prevents ER stress. *PNAS* 112: E6166-E6174. doi: 10.1073/pnas.1519384112
 13. Wen-Xing D & Xiao-Ming Y. 2012. Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles and analysis. *Biological Chemistry* 393: 547-564. doi: 10.1515/hsz-2012-0119
 14. Herzig S & Shaw RJ. 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 121-135. doi: 10.1038/nrm.2017.95
 15. Korolchuk VI, Menzies FM & Rubinsztein DC. 2009. Mechanisms of cross-talk between the ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome systems. *FEBS Letters* 584: 1393-1398. doi: 10.1016/j.febslet.2009.12.047
 16. Yang S, Wang X, Contino G, Liesa M, Sahin E, Ying H, Bause A, Li Y, Stommel JM, Dell'antonio G, Mautner J, Tonon G, Haigis M, Shirihai OS, Doglioni C, Bardeesy N & Kimmelman AC. 2011. Pancreatic cancer require autophagy for tumor growth. *Genes & Development* 25: 717-729. doi: 10.1101/gad.2016111
 17. Wong PM, Feng Y, Wang J, Shi R & Jiang X. 2015. Regulation of autophagy by coordinated action of mTORC1 and protein phosphatase 2A. *Nature Communications* 6. doi: 10.1038/ncomms9048
 18. Ma Y. 2016. Role of autophagy in cancer therapy. En: Hayat MA. *Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection and Aging*. Elsevier. pp: 231-251.
 19. Fuji S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H & Ochiai A. 2008. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Science* 99: 1813-1819. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00893.x
 20. Rai Y, Pathak R, Kumari N, Sah DK, Pandey S, Kalra N, Soni R, Dwarakanath BS & Bhatt AN. 2018. Mitochondrial biogenesis and metabolic hyperactivation limits the application of MTT assay in the estimation of radiation induced growth inhibition. *Scientific Reports* 8. doi: 10.1038/s41598-018-19930-w
 21. Yan C & Li TS. 2018. Dual role of mitophagy in cancer drug resistance. *Anticancer Research* 38: 617-621. doi: 10.21873/anticancer.12266
 22. Medina DL, Fraldi A, Bouche V, Annunziata F, Mansueto G, Spampanato C, Puri C, Pignata A, Martina JA, Sardiello M, Palmieri M, Polishchuk R, Puertollano R & Ballabio A. 2011. Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance. *Developmental Cell* 21: 421-430. doi: 10.1016/j.devcel.2011.07.01
 23. Saftig P & Klumperman J. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10: 623-635. doi: 10.1038/nrm2745
 24. Chiu HW, Lin SW, Lin LC, Hsu YH, Lin YF, Ho SY, Wu YH & Wang YJ. 2015. Synergistic antitumor effects of radiation and proteasome inhibitor treatment in pancreatic cancer through the induction of autophagy and the downregulation of TRAF6. *Cancer Letters* 365: 229-239. doi: 10.1016/j.canlet.2015.05.02
 25. Kocaturk NM & Gozuacik D. 2018. Crosstalk between mammalian autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 6. doi: 10.3389/fcell.2018.00128

7.- AGRADECIMIENTOS

La realización de este Trabajo Fin de Máster ha sido posible gracias a José Neptuno Rodríguez López y María Fernanda Montenegro Arce, *my role models*. Quiero agradecerles la confianza que han puesto en mí en todo momento, la motivación y el apoyo constantes, el hacer que todo sea fácil. Durante este año han cambiado muchas de mis preguntas, pero también han traído consigo todas las respuestas. Es cierto que la suerte son personas.

ANEXO I. Anticuerpos primarios empleados en Western Blot

Proteína reconocida	Tipo	Procedencia
β -actina	Monoclonal, clon AC-15	Sigma
TFEB, C-terminal	Policlonal	Sigma
TFE3	Policlonal	Sigma
MITF	Monoclonal, clon C5	Millipore
p-ULK1 (Ser ⁷⁷⁷)	Policlonal	Sigma
AMPK α 1	Monoclonal, clon 9Q34	Thermo Scientific
p-AMPK α 1 (Thr ¹⁷²)	Monoclonal, clon 10H2L20	Thermo Scientific
LC3B	Policlonal	Abcam
PGC1 α	Monoclonal, clon 4A8	Santa Cruz Biotechnology

ANEXO II. Primers utilizados en la qPCR y condiciones de la RT

Gen amplificado	Secuencia 5'-3' forward	Secuencia 5'-3' reverse
β -actina	AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC	GGG GTG TTG AAG GTC TCA AA
SIRT1	TGC TGG CCT AAT AGA GTG GCA	CTC AGC GCC ATG GAA AAT GT
MFF	CCA AAC GCT GAC CTG GAA C	TTT CCT GCT ACA ACA ATC CTC TCC
PGC1 α	AGC CTC TTT GCC CAG ATC TT	GGC AAT CCG TCT TCA TCC AC

Condiciones de la RT: . La retrotranscripción se realizó a partir de 6 μ l de ARN, 2.5 μ l de agua ultrapura y 10.5 μ l de la mezcla de reacción (10 μ l de tampón de reacción compuesto por TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl₂ 15 mM, 5 μ l de ditrirotol 0.1 M, 5 μ l de cebadores o *random primers*, 2.5 μ l de dNTPs 10 mM y 1.25 μ l de inhibidor de ribonucleasas 130 U/ μ l). Esta mezcla final fue calentada a 42°C durante 2 min para después añadirle 1 μ l de retrotranscriptasa M-MLV RT. Seguidamente, se continuó con el programa de la retrotranscripción a 42°C durante 50 min y a 70°C durante 15 min, obteniéndose el cDNA.

ANEXO III. Tareas concretas realizadas dentro de la investigación

Durante la realización de este Trabajo Fin de Máster, se han llevado a cabo las siguientes tareas:

- Búsqueda, lectura y análisis de bibliografía.
- Manejo de cultivos celulares: siembra, tripsinización, recuento de células con cámara de Neubauer y ensayo azul tripán, congelación, etc.
- Irradiación de cultivos celulares.
- Mantenimiento y calibración del equipamiento de laboratorio.
- Preparación de tampones y reactivos necesarios para llevar a cabo los ensayos.
- Planificación y realización práctica de los distintos experimentos.
- Tratamiento de los datos obtenidos.
- Análisis e interpretación de resultados.
- Redacción de la memoria del TFM.

ANEXO IV. Asignaturas cursadas

Las asignaturas cursadas en el Máster de Biología Molecular y Biotecnología hasta completar los 60 ECTS han sido:

- SEMINARIOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA (6 ECTS)
- BIOINFORMÁTICA (6 ECTS)
- BIOMEMBRANAS: ESTRUCTURA, APLICACIONES Y SEÑALIZACIÓN CELULAR (6 ECTS)
- ENZIMOLOGÍA APLICADA (6 ECTS)
- NUEVOS MODELOS ANIMALES EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA (6 ECTS)
- TÉCNICAS ELECTROFORÉTICAS (6 ECTS)

ANEXO V. Declaración de originalidad

Pilar María Poyatos Romera, estudiante del Máster en Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Biología de la Universidad de Murcia, declaro:

Que el Trabajo de Fin de Máster que presento para su exposición y defensa titulado “La mitofagia como un mecanismo de resistencia de las células de cáncer de páncreas a la radioterapia” y cuyos tutores son D. José Neptuno Rodríguez López y Dña. María Fernanda Montenegro Arce es original y que todas las fuentes utilizadas han sido debidamente citadas en el mismo.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Pilar Poyatos Romera', with some overlapping loops and a horizontal line through the middle.

Murcia, a 5 de julio de 2019