

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**DESCUBRIMIENTO DE NUEVAS DIANAS
TERAPÉUTICAS MEDIANTE UN SISTEMA
DE SELECCIÓN RACIONAL DE LÍNEAS
TUMORALES DE CÁNCER DE PÁNCREAS
ADAPTADAS A LA INHIBICIÓN DE RUTAS
DE SEÑALIZACIÓN**

Memoria presentada por HUGO ARASANZ ESTEBAN para optar al grado de
Doctor en Ciencias de la Salud por la Universidad Pública de Navarra

El trabajo detallado en esta memoria ha sido realizado bajo el auspicio del grupo de Inmunomodulación de Navarrabiomed / Fundación Miguel Servet, Instituto de Investigación Sanitaria de Navarra (IdiSNA) bajo la dirección del **Dr. David Escors** y la **Dra. Grazyna Kochan**.

Pamplona, Noviembre de 2019

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David Escors y a la Dra. Grazyna Kochan, por su perseverancia y paciencia para formar a un médico sin experiencia previa en investigación básica, por el apoyo brindado en todo momento a nivel profesional y por la amistad ofrecida en lo personal. Al Dr. Ignacio Encío, por toda la ayuda y consejos que he recibido por su parte durante estos años.

Al grupo de Inmunomodulación de Navarrabiomed / Fundación Miguel Servet al completo, incluyendo tanto a los miembros actuales como a aquellos que han pasado durante todo el tiempo que llevo formando parte del mismo.

Quiero hacer especial mención a Miren Zuazo, investigadora tan versátil como incansable que ha sido durante los últimos años un soporte fundamental dentro del laboratorio, y a la Dra. María Gato, una de las personas que más me ayudó en mis primeros pasos en la investigación básica. Además de ser para mí ambas grandes amigas, juntas eran capaces de hacer hasta divertidos esos días de laboratorio exasperantes en los que todos los experimentos salen al revés. A ambas quiero agradecer también que me hayan permitido participar en las investigaciones de altísimo nivel que son sus proyectos de Tesis Doctoral.

También quiero destacar a otros compañeros y amigos que han hecho que ir a trabajar fuese siempre un placer, además de haber estado siempre dispuestos a invertir parte de su tiempo en mi aprendizaje o en el propio proyecto, entre ellos la Dra. Idoia Blanco, Virginia Arteta, la Dra. María Ibáñez, Gonzalo Fernández, la Dra. Ana Bocanegra, el Dr. Carlos Hernández y Luisa Chocarro.

La contribución de todas estas personas al proyecto y a mi formación como investigador ha sido inestimable.

A los compañeros del servicio de Oncología Médica del Complejo Hospitalario de Navarra, por la excelente formación que recibí por su parte durante los años de especialización, que supuso un gran estímulo a mi interés por la investigación. Un especial agradecimiento a Susana De La Cruz, que fue quien me puso en contacto con el Dr. David Escors y me facilitó continuar colaborando con su grupo, a Irene Hernández y Nuria Láinez, quienes en su papel como tutoras apoyaron sin reservas que compaginase mi labor asistencial con la actividad en el laboratorio, al Dr. Antonio Viúdez, clínico e investigador siempre dispuesto a ayudar y orientar a toda persona con interés en la ciencia, y a Ruth Vera, quien como jefa de servicio siempre ha fomentado la investigación en el

departamento, y en mi caso particular me ha dado grandes oportunidades para continuar con mi desarrollo profesional.

Por supuesto, también a los médicos residentes con los que compartí esta etapa formativa, destacando a Jose Rivadeneira, Ángela Fernández de Lascoiti y Alejandra Lacalle. Han sido un eje muy importante en mi aprendizaje, siempre he contado con su apoyo y consejo y, además, se han convertido en amigos de los que hay que conservar.

Al resto de trabajadores de Navarrabiomed, con especial cariño a la Dra. Esperanza Martín, Saioa Mendaza e Iñaki Monreal del grupo de Patología Molecular del Cáncer; la Dra. Paula Aldaz, Irene Lasheras y Marta Redondo del grupo de Señalización en Cáncer; y sus respectivos jefes de grupo, el Dr. David Guerrero y el Dr. Imanol Arozarena. Tanto en el trato diario como en pequeñas colaboraciones experimentales ha sido un placer compartir lugar de trabajo.

Al Dr. Joaquín Fernández y al Dr. Enrique Santamaría del grupo de Proteómica por su excelente colaboración con los estudios de proteómica cuantitativa, parte indispensable del proyecto.

A la Dra. Eva Santamaría y al Dr. Carlos Rodríguez, por su disponibilidad y cercanía para la realización de los experimentos de respiración y glicolisis.

Por último a Ana, quien no sólo apoyó de forma incondicional mi incursión en la investigación sino que tampoco protestó ni una vez cuando durante varios años estuve llegando a casa varias horas más tarde de lo que me correspondía. A Julia, quien realmente no ha jugado ningún papel directo en el desarrollo de esta tesis pero me ha hecho estar de un humor excelente día tras día, lo que estimula la concentración y el trabajo, y favorece que las ideas fluyan. A mis padres, Carmen y Jorge, y a mi hermano Nacho, siempre (o casi siempre) de acuerdo con las decisiones que he tomado en mi vida académica y profesional, y a menudo orgullosos de los resultados. A mi abuela Carmen, mi mayor y más fiel seguidora; es posible que nunca me den un premio en Asturias, pero esto es un comienzo. A mis suegros, Cristina y Fernando, que han sido siempre de gran ayuda en todo lo que he necesitado.

ÍNDICE

ESTADO DE LA CUESTIÓN.....	1
1. EPIDEMIOLOGÍA.....	1
1.1. Factores de riesgo.....	1
1.2. Diagnóstico.....	4
1.3. Pronóstico.....	5
2. MANEJO.....	5
3. HISTOPATOLOGÍA Y ALTERACIONES MOLECULARES.....	6
3.1. Perfil Genético.....	7
4. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA.....	10
4.1. PI3K/AKT/mTOR.....	10
4.1.1. Señalización de autorregulación (<i>Feedback</i>) negativa.....	12
4.1.2. Tratamientos dirigidos contra PI3K/AKT/mTOR.....	13
4.1.3. Función diferencial de las isoformas de AKT en señalización intracelular.....	16
5. METABOLISMO MITOCONDRIAL Y CÁNCER.....	21
5.1. Funciones de la mitocondria.....	22
5.1.1. Producción de energía y biosíntesis.....	22
5.1.2. Señalización.....	25
5.2. Crecimiento tumoral.....	25
5.2.1. Regulación de glicolisis en la célula cancerosa.....	27
5.2.2. Defectos en enzimas mitocondriales.....	29
6. DESDIFERENCIACIÓN CELULAR Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	30
6.1. Células madre cancerosas y autofagia.....	32
6.2. Susceptibilidad de las células madre cancerosas a metformina.....	33
OBJETIVOS.....	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
1. CULTIVOS CELULARES.....	39
2. DISEÑO DE ARNs INTERFERENTES Y CLONAJE DE ADN PLASMÍDICO.....	40
3. GENERACIÓN DE LENTIVECTORES.....	42
4. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS CON LENTIVECTORES Y SELECCIÓN CON ANTIBIÓTICOS.....	43
5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (<i>Western Blot</i>).....	44
6. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	45
7. ESTUDIOS DE DINÁMICA CELULAR.....	46
7.1 Proliferación celular.....	46
7.2 Apoptosis.....	46
7.3 Crecimiento celular.....	46
7.4 Desdiferenciación celular.....	47
7.5 Evaluación de autofagia.....	47
8. PROTEÓMICA CUANTITATIVA DIFERENCIAL.....	48
8.1 Preparación de las muestras.....	48
8.2 Análisis proteómico mediante iTRAQ.....	48
8.3 Espectrometría de masas triple-TOF 5600.....	49
9. GENERACIÓN DE INTERACTOMAS FUNCIONALES.....	50
10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIANA (IC50).....	50
11. TINCIONES MITOCONDRIALES.....	51

12. MEDICIÓN DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL.....	52
13. MODELOS DE CÁNCER PANCREÁTICO MURINO.....	53
13.1 Sinergia entre inhibición farmacológica de AKT y metformina como terapia <i>in vivo</i>	53
13.2. Eficacia del tratamiento con metformina en cáncer de páncreas adaptado a la inhibición farmacológica de AKT <i>in vivo</i>	54
14. ESTADÍSTICA.....	54
RESULTADOS.....	55
1. SILENCIAMIENTO DE LAS ISOFORMAS DE AKT EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS METASTÁSICO HUMANO CRL1682/ASPC-1.....	56
1.1. La adaptación frente al silenciamiento individual de las isoformas de AKT en la línea de adenocarcinoma de páncreas CRL1682/AsPC-1 tiene un efecto diferencial sobre la proliferación y apoptosis.....	59
2. ESTUDIOS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA DIFERENCIAL.....	63
2.1. Interactomas funcionales específicos a partir de las proteínas diferencialmente sobreexpresadas en cada línea celular.....	66
2.2. Interactomas funcionales específicos a partir de las proteínas diferencialmente infraexpresadas en cada línea celular.....	70
2.3. Interactomas funcionales integrados obtenidos con Ingenuity Pathway Analysis.....	74
2.4. Validación de los resultados de proteómica por <i>Western Blot</i>	80
2.5. La adaptación al silenciamiento individual de las isoformas de AKT revierte el efecto Warburg.....	81
2.6. Las células de adenocarcinoma de páncreas adaptadas al silenciamiento de AKT1 adoptan un fenotipo de células madre cancerosas.....	84
2.7. Las células adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT presentan un aumento de la autofagia.....	86
2.8. La activación constitutiva de C-MYC revierte la desdiferenciación de las células de adenocarcinoma de páncreas.....	87
3. EVALUACIÓN DE LA SINERGIA ENTRE EL SILENCIAMIENTO DE LAS ISOFORMAS DE AKT Y TERAPIAS DIRIGIDAS FRENTE A LA MITOCONDRIA.....	91
3.1. Sensibilidad diferencial a terapias dirigidas frente a la mitocondria en las líneas celulares modificadas.....	91
3.2. Efectos de la inhibición genética de genes mitocondriales después de la adaptación al silenciamiento de AKT1.....	92
3.2.1. El doble silenciamiento de AKT1 y TFB2M aumenta apoptosis, disminuye proliferación y limita el crecimiento celular.....	93
3.2.2. El doble silenciamiento de AKT1 y TFB2M, pero no el de HARS2 o el de SSBP1, disminuye la masa mitocondrial.....	96
4. ESTUDIOS TERAPÉUTICOS EN MODELOS MURINOS DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS.....	97
4.1. La metformina ejerce un efecto sinérgico a la inhibición bioquímica de AKT en un modelo de ratón de adenocarcinoma de páncreas murino.....	97
4.2. La metformina controla de forma eficaz el crecimiento de tumores procedentes de células de adenocarcinoma de páncreas murino adaptadas a la inhibición de AKT.....	99
4.2.1. Adaptación de las células Panc02 a la inhibición sostenida de AKT.....	100
4.2.2. Efectos terapéuticos de la metformina sobre los tumores procedentes de las células adaptadas a la inhibición de AKT.....	103
DISCUSIÓN.....	105

1. ADAPTACIÓN A LA INHIBICIÓN SOSTENIDA DE AKT.....	106
1.1. Función diferencial de las isoformas de AKT en adenocarcinoma de páncreas.....	106
1.2. Estudios de proteómica cuantitativa diferencial.....	108
2. METABOLISMO MITOCONDRIAL.....	109
2.1. Aumento de masa mitocondrial y potenciación de la función mitocondrial.....	110
2.2. Sinergia de la inhibición de las isoformas de AKT con terapias dirigidas frente al metabolismo mitocondrial.....	110
2.3. Inhibición génica de las rutas de escape al silenciamiento mantenido de AKT.....	111
3. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS.....	112
3.1. Desdiferenciación a células madre cancerosas.....	113
4. EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> EN MODELOS MURINOS.....	115
CONCLUSIONES.....	117
ANEXO.....	119
PUBLICACIÓN EN REVISTA ONCOTARGET.....	120
BIBLIOGRAFÍA.....	130

ESTADO DE LA CUESTIÓN

1. EPIDEMIOLOGÍA

El adenocarcinoma de páncreas es una de las neoplasias más agresivas, estimándose una supervivencia a 5 años inferior al 10% independientemente del estadio en el momento del diagnóstico. A pesar de que no se encuentra entre los tumores sólidos más prevalentes su incidencia no es desdeñable, y se calcula que anualmente se diagnostican alrededor de 450,000 nuevos casos a nivel mundial, con más de 7,500 casos sólo en España (Bray F *et al*, 2018). La incidencia anual estandarizada por edad en los países desarrollados es del 7.3 por 100,000 en varones y 5.1 por 100,000 en mujeres, con una mortalidad de 6.7 por 100,000 y 4.7 por 100,000, respectivamente (Torre LA *et al*, 2015).

La edad mediana de aparición es de 71 años, y los pacientes menores de 55 años suponen menos del 10% de los casos. Su incidencia es significativamente mayor en los individuos de raza negra respecto a otros grupos. La causa de esta disparidad es desconocida y, puesto que la presencia de factores como el tabaquismo o la ingesta enólica elevada es similar entre personas caucásicas y afroamericanas en Estados Unidos, no se podría explicar por distintos hábitos de vida (National Center for Health Statistics, 2011).

1.1. Factores de riesgo

Se han identificado múltiples factores de riesgo que pueden favorecer el desarrollo de esta enfermedad (Maissonneuve P *et al*, 2015). El tabaco es uno de los factores mejor establecidos, a pesar de que el aumento del riesgo que produce es moderado. El meta-análisis de Iodice, que incluía 82 estudios, detectó un riesgo relativo (RR) de desarrollar carcinoma de páncreas de 1.74 para fumadores (IC95% 1.61-1.87) y 1.2 para ex-fumadores (IC95% 1.11-1.29) (Iodice S *et al*, 2008). Otros trabajos han confirmado estos datos tanto en población occidental (Bosetti C *et al*, 2012; Lynch SM *et al*, 2009) como oriental (Ansary-Moghaddam A *et al*, 2006; Matsuo K *et al*, 2011), con tasas de riesgo similares cuyas cifras oscilan entre 1.6 y 2.2 para fumadores y entre 1.1 y 1.2 para ex-fumadores.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Tradicionalmente se ha considerado que el consumo de alcohol podía ser también un factor de riesgo por su relación con patologías que condicionan un mayor riesgo de desarrollar esta neoplasia, como pueden ser la pancreatitis crónica y la Diabetes Mellitus no-insulino dependiente. En la mayor parte de estudios publicados no se había conseguido demostrar esta asociación (Bouchardy C *et al*, 1990; Bueno de Mesquita HB *et al*, 1992; Clavel F *et al*, 1989); sin embargo, recientemente se han presentado varios trabajos que han detectado un incremento moderado del riesgo cuando el consumo alcanza los 30 gramos de alcohol al día o las 3 bebidas diarias, con un RR de 1.22 (Genkinger JM *et al*, 2009; Tramacere I *et al*, 2010).

Se ha sugerido una relación directamente proporcional entre la altura y el riesgo de cáncer de páncreas, describiéndose un aumento del 7-8% por cada 5 cm de altura; no obstante, los datos hasta el momento son insuficientes para poder extraer esta conclusión (Aune D *et al*, 2012). Sí que existe más evidencia de la relación entre el cáncer de páncreas y el índice de masa corporal (IMC), con un aumento del riesgo de un 10% por cada 5 unidades de IMC, mientras que el ejercicio físico podría actuar como factor protector (Arslan AA *et al*, 2010; Aune D *et al*, 2012; Bao Y *et al*, 2008; Berrington de Gonzalez A, 2003; Genkiger JM *et al*, 2011; Jiao L *et al*, 2010; Larsson SC *et al*, 2007; O'Rorke MA *et al*, 2010).

Es posible que la dieta pueda influir también en el desarrollo de esta enfermedad, tanto favoreciendo su aparición como disminuyendo el riesgo. El consumo de frutas y verduras o una dieta rica en ácido fólico parecen reducir la incidencia, mientras que la ingesta de carne roja, carne procesada, el consumo de refrescos o la toma de fructosa podrían ser factores de riesgo. No obstante, los diferentes estudios presentan resultados contradictorios y el nivel de evidencia es limitado (Aune D *et al*, 2012; Bae JM *et al*, 2009; Gallus S *et al*, 2011; Genkiger JM *et al*, 2009; Koushik A *et al*, 2012; Larsson SC *et al*, 2012; Lin HL *et al*, 2013; Paluszkiewicz P *et al*, 2012).

Existen diferentes enfermedades cuya asociación con el carcinoma de páncreas es bien conocida. Como ya se ha mencionado, la Diabetes Mellitus es un factor de riesgo y varios meta-análisis le atribuyen un aumento de la incidencia de hasta el 50%; la pancreatitis crónica se relaciona de igual forma con esta neoplasia (RR = 2) (Ben Q *et al*, 2011; Duell EJ *et al*, 2012; Everhart J *et al*, 1995; Huxley R *et al*, 2005; Raimondi S *et al*, 2010; Stevens RJ *et al*, 2007). En análisis observacionales se ha detectado un efecto protector del tratamiento con metformina en pacientes diabéticos, no

obstante no se observó en dos estudios randomizados (Franciosi M *et al*, 2013). Se ha descrito cierta relación entre la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) y el cáncer de páncreas, con RR entre 1.2 y 3.8, y también la infección por el virus de la hepatitis C (RR 1.2) (Fiorino S *et al*, 2013; Li L *et al*, 2013; Luo G *et al*, 2013; Wang Y *et al*, 2013; Xu JH *et al*, 2013). Por último, haber sido sometido a intervenciones quirúrgicas como gastrectomía o colecistectomía también han sido identificados como factores de riesgo en diferentes meta-análisis y análisis de datos agrupados, aunque se considera que, puesto que este incremento de la incidencia se observa durante los primeros años tras la intervención, puede ser debido a una vigilancia más estrecha (Bosetti C *et al*, 2013; Gong Y *et al*, 2012; Lin G *et al*, 2012). En cuanto a factores ocupacionales, varios meta-análisis han detectado un incremento del riesgo de desarrollar carcinoma de páncreas con la exposición a hidrocarburos clorados (RR = 1.4 – 2.2), al níquel (RR = 2), o al formaldehído (RR = 1.1) (Collins JJ *et al*, 2001; Ojajärvi A *et al*, 2000, 2001 y 2007).

Si bien el carcinoma de páncreas no es una de las neoplasias con mayor agregación familiar, y se ha estimado que los factores hereditarios contribuyen al 5-10% del total de los casos, se sabe que variantes de los genes *APC* (poliposis adenomatosa familiar), *ATM* (ataxia-telangiectasia), *BRCA1* y *BRCA2* (síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario), *CDKN2A* (síndrome de melanoma y lunares múltiples atípicos familiares), *CTFR* (fibrosis quística), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (síndrome de Lynch), *PALB2*, *PRSSI* (pancreatitis hereditaria) y *STK11* (síndrome de Peutz-Jeghers) aumentan el riesgo de aparición de esta enfermedad (Permuth-Wet J *et al*, 2009; Solomon S *et al*, 2012). E incluso, sin presentar ninguna de estas alteraciones genéticas, un antecedente familiar de carcinoma de páncreas asocia un incremento del riesgo del 80% (Permuth-Wet J *et al*, 2009).

Por último, el consumo de café y té, la toma de ácido acetilsalicílico, anti-inflamatorios no-esteroides (AINEs) o estatinas, o los niveles séricos de vitamina D también han sido propuestos, pero los estudios más recientes no han detectado ninguna correlación con el riesgo de carcinoma de páncreas (Bonovas S *et al*, 2008; Genkiger JM *et al*, 2012; Larsson SC *et al*, 2006; Liu SL *et al*, 2013).

1.2. Diagnóstico

El 60-70% de los carcinomas de páncreas se originan en la cabeza de este órgano, el 20-25% en cuerpo y cola mientras que el 10% restante presentan afectación difusa. En el momento del diagnóstico el 15-20% de los tumores están localizados y son subsidiarios de intervención quirúrgica, y a pesar de ello tan solo el 20% de los pacientes estarán vivos a los 5 años (Ducreux M *et al*, 2015; Sener SF *et al*, 2015).

Los primeros síntomas que pueden conducir al diagnóstico están muy influenciados por la localización de la neoplasia (Ducreux M *et al*, 2015). En tumores de cabeza de páncreas los más habituales son pérdida de peso (92%), ictericia (82%), dolor abdominal (72%), esteatorrea (62%) y náuseas o vómitos (45%), mientras que en cuerpo y cola de páncreas predominan el síndrome constitucional (100%), dolor abdominal (87%), náuseas o vómitos (43%) y estreñimiento (27%). Tumores localmente muy avanzados pueden llegar a provocar oclusión intestinal (Freelove R *et al*, 2006).

Ante la sospecha de un adenocarcinoma de páncreas, la prueba de imagen de elección es la tomografía computerizada (TC), aunque la sensibilidad para metástasis hepáticas de pequeño tamaño o lesiones peritoneales es limitada. Cuando existen dudas acerca del origen de lesiones hepáticas indeterminadas, de la extensión de la enfermedad o cuando existe alta sospecha pero la TC no detecta ninguna alteración patológica, la resonancia magnética y la ecoendoscopia pueden tener un papel relevante para completar el estudio, aunque no se considera que sean técnicas que se deban utilizar de forma rutinaria (Agarwal B *et al*, 2004; Deerenberg EB *et al*, 2011; Nawaz H *et al*, 2013; Schima W *et al*, 2007; Vachiranubhap B *et al*, 2009; Varadarajulu S *et al*, 2004). En cuanto a la tomografía por emisión de positrones (PET), su papel en el diagnóstico y la estadificación del adenocarcinoma de páncreas no está bien establecido, aunque un estudio observó que la combinación de PET y PET/TC aumentaba la sensibilidad para la detección de metástasis hepáticas hasta el 87%, en comparación con PET/TC (61%) o TC (57%) por separado (Farma JM *et al*, 2008).

1.3. Pronóstico

A pesar de los importantes avances que se han producido en diferentes enfermedades oncológicas, con la aparición de nuevos tratamientos y estrategias terapéuticas que han permitido mejorar sustancialmente el pronóstico de los pacientes, en el adenocarcinoma de páncreas los cambios acontecidos han sido de menor magnitud.

Cuando la enfermedad está localizada y es subsidiaria de intervención quirúrgica, la supervivencia global (SG) a 5 años se sitúa en torno al 20% (Geer RJ *et al*, 1993; Trede M *et al*, 1990; Yeo CJ *et al*, 1995). En carcinomas sin afectación ganglionar, en un estudio descriptivo la SG mediana fue significativamente mayor que en aquellos tumores con adenopatías asociadas (25.4 meses frente a 14.8 meses) (Kang MJ *et al*, 2014). En cuanto a la enfermedad metastásica, la SG mediana es inferior a los 12 meses, y tan sólo un 2.8% de los pacientes están vivos 5 años después del diagnóstico (Bilimoria KY *et al*, 2007).

2. MANEJO

El manejo en el contexto de enfermedad avanzada se basa en la administración de combinaciones de quimioterápicos, habiéndose demostrado la actividad de las fluoropirimidinas, irinotecán, derivados del platino, gemcitabina, taxanos, irinotecán nanoliposomal, entre otros.

En pacientes no tratados, los dos esquemas que han demostrado un mayor beneficio son FOLFIRINOX y gemcitabina con nab-paclitaxel.

El primero consiguió su aprobación en base a los resultados del estudio fase III PRODIGE, en el que pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas metastásico eran aleatorizados a recibir durante 6 meses quimioterapia con 5-fluorouracilo 400 mg/m² en *bolus* seguido de infusión continua de 2.400 mg/m² durante 46 horas, oxaliplatino 85 mg/m² e irinotecán 150 mg/m² cada 2 semanas, o el tratamiento estándar de entonces, gemcitabina 1000 mg/m² cada 7 días durante 7 semanas seguidas y a continuación días 1, 8 y 15 cada 28 días. FOLFIRINOX se asoció con un beneficio en tasas de respuesta global (31.6% frente a 9.4%, $p < 0.001$), en supervivencia libre de progresión mediana (6.4 meses frente a 3.3 meses, $p < 0.001$) y en supervivencia global mediana

(11.1 meses frente a 6.8 meses, $p < 0.001$) (Conroy T *et al*, 2011).

La combinación de nab-paclitaxel y gemcitabina, se posicionó en primera línea de tratamiento a raíz de lo observado en el estudio MPACT, publicado en el 2013. Este estudio de fase III comparaba gemcitabina a las dosis del estudio PRODIGE junto con nab-paclitaxel 125 mg/m² frente a gemcitabina 1.000 mg/m² días 1, 8 y 15 cada 28 días, y también detectó un beneficio en tasas de respuesta (23% frente a 7%, $p < 0.001$), supervivencia libre de progresión mediana (5.5 meses frente a 3.7 meses, $p < 0.001$) y supervivencia global mediana (8.5 meses frente a 6.7 meses, $p < 0.001$) (Von Hoff DD *et al*, 2013).

Por último, la adición de erlotinib 100 mg o 150 mg cada 24 horas a gemcitabina demostró ser superior a gemcitabina en monoterapia en el estudio NCIC CTG PA.3 en términos de supervivencia global (6.24 meses vs 5.91 meses, $p = 0.038$). No obstante, puesto que el beneficio apenas alcanza los 10 días en términos absolutos, este esquema no se utiliza de forma habitual (Moore MJ *et al*, 2007).

En cuanto a pacientes ya tratados, uno de los estudios de fase III publicados más recientemente ha sido NAPOLI-1, que evalúa la eficacia de irinotecán-liposomal en dicho contexto. En este ensayo clínico se aleatorizaba a pacientes diagnosticados de adenocarcinoma de páncreas localmente avanzado o metastásico en progresión a una primera línea de quimioterapia basada en gemcitabina, a recibir irinotecán-liposomal 120 mg/m² cada 3 semanas, 5-fluorouracilo y ácido folínico o la combinación de ambos con irinotecán-liposomal 80 mg/m² cada 2 semanas. Se comprobó que los pacientes a los que se les administró la combinación obtuvieron un beneficio en OS en comparación con irinotecán-liposomal en monoterapia o 5-fluorouracilo y ácido fólico (6.1 meses frente a 4.9 meses y 4.2 meses, $p = 0.012$), aunque a costa de mayor toxicidad (Wang-Gillam A *et al*, 2016).

3. HISTOPATOLOGÍA Y ALTERACIONES MOLECULARES

Actualmente se sabe que el desarrollo del carcinoma invasivo pasa previamente por lesiones precursoras benignas, entre las que se encuentran las neoplasias pancreáticas intraepiteliales (PanIN), las neoplasias mucinosas papilares intraductales (IPMNs) y las neoplasias quísticas mucinosas (MCN) (Andea A *et al*, 2003; Distler M *et al*, 2014; Matthaei H *et al*, 2011; Zamboni G *et al*, 2013).

Las PanIN son las principales lesiones precursoras del adenocarcinoma de páncreas, y también las mejor conocidas. Se trata de lesiones microscópicas planas o papilares originadas en los conductos pancreáticos intralobulares, que no penetran la membrana basal, compuestas por células columnares o cuboideas. Se clasifican en 3 grados en función de su distancia con la estructura normal del páncreas. PanIN-1A son lesiones de bajo grado planas con mínima atipia citológica y estructural, mientras que PanIN-1B adoptan una conformación papilar. PanIN-2 presentan atipia moderada con arquitectura papilar y anomalías nucleares como pleomorfismo, aglomeración, hiperchromatismo o pseudoestratificación. Finalmente, en las lesiones PanIN-3, también denominadas *carcinoma in-situ*, se detecta una estructura cribiforme con necrosis luminal y atipia citológica severa, con morfología caliciforme, nucleolos prominentes y pérdida de polaridad nuclear. Estas últimas pueden ser difíciles de diferenciar del adenocarcinoma invasivo (Distler M *et al*, 2014).

Respecto al adenocarcinoma ductal de páncreas, éste conforma una masa blanco-amarillenta mal delimitada, con fibrosis y atrofia circundantes. A nivel microscópico puede presentarse como tumores con una arquitectura ductal bien diferenciada o tratarse de carcinomas muy indiferenciados en los que la estructura no es distinguible. Es corriente el desarrollo de una reacción estromal intensa por las células tumorales, lo que se considera que puede dificultar la llegada del tratamiento quimioterápico al tumor, además de convertirse en un nicho paracrino para la neoplasia (Hermann PC *et al*, 2013; Rishi A *et al*, 2015).

3.1. Perfil genético

En el proceso de la carcinogénesis pancreática se han identificado múltiples alteraciones a nivel genético.

Se considera que posiblemente la lesión inicial fundamental sea la mutación del oncogen *K-RAS*, cuya frecuencia aumenta progresivamente de acuerdo con el grado de PanIN, estando presente en el 36% de los PanIN-1A, en el 44% de los PanIN-1B y alcanzando el 87% en PanIN-3. Este gen codifica a la proteína K-RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), un miembro de la familia de las GTPasas. Su mutación produce una activación constitutiva de la misma, lo que lleva a

la activación de cascadas de señalización corriente abajo como la vía de las MAPK (*mitogen-activated protein-kinase*) o la vía de PI3K (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*), relacionadas con la diferenciación, proliferación y supervivencia celular (Distler M *et al*, 2014; Löhr M *et al* 2005; Rishi A *et al*, 2015). Además se ha sugerido que esta alteración puede afectar también a la respuesta fibroinflamatoria estromal propia del adenocarcinoma de páncreas, que dificulta la disponibilidad de la quimioterapia a nivel tumoral, mediante la suprarregulación del eje GLI1/IL6 a través de la vía SHH (*Sonic Hedgehog*) (Mills LD *et al*, 2013).

El acortamiento de los telómeros es también un evento precoz en la carcinogénesis pancreática, estando relacionado con inestabilidad cromosómica y, por lo tanto, con mayor riesgo de aparición de mutaciones (Distler M *et al*, 2014; Rishi A *et al*, 2015; Van Heek NT *et al*, 2002).

Son igualmente fundamentales en el desarrollo del cáncer de páncreas exocrino la inactivación de los genes supresores de tumores *p16/CDKN2A*, *TP53* (*tumor protein 53*) y *SMAD4/DPC4* (*SMAD family member 4*). La función de *p16/CDKN2A* se encuentra alterada en la práctica totalidad de los adenocarcinomas de páncreas, y este fenómeno se produce en etapas iniciales de la tumorigénesis. Este gen codifica a la proteína p16^{INK4A}, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina D (CDK4 y CDK6) que en condiciones normales impide la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (pRB) y por lo tanto la progresión del ciclo celular de la fase G₁ a la fase S. Su inactivación provoca una pérdida de control del ciclo celular, favoreciendo la proliferación (Caldas C *et al*, 1994; Distler M *et al*, 2014; Rishi A *et al*, 2015).

La proteína p53 codificada por el gen *TP53* también se relaciona con la regulación del ciclo celular, aunque mediante el arresto a nivel de la fase G₂/M, con mecanismos de reparación del ADN y con la inducción de la apoptosis. Esta inactivación no se presenta hasta etapas tardías del desarrollo del carcinoma de páncreas, normalmente hasta PanIN-3, aunque está presente en el 75% de los carcinomas invasivos (Distler M *et al*, 2014; Rishi A *et al*, 2015; Pellegata NS *et al*, 1994).

Por último, la mutación de *SMAD4/DPC4* se produce también en fases avanzadas, aunque su proporción en el adenocarcinoma ya establecido es algo inferior, en torno al 55%. Su producto, la proteína Smad4, juega un papel importante en la transmisión de señales de la vía del *transforming growth factor β* (TGF-β), y su inactivación se asocia con una pérdida de los efectos antiproliferativos de TGF-β (Distler M *et al*, 2014; Rishi A *et al*, 2015; Jones S *et al*, 2008). El silenciamiento de *SMAD4/DPC4* se ha asociado con un peor pronóstico en el adenocarcinoma de páncreas (Blackford A *et al*, 2009; Tascilar M *et al*, 2001).

ESTADO DE LA CUESTIÓN

De todas maneras, este modelo basado en la adquisición consecutiva de mutaciones está siendo cuestionado. En un artículo publicado en Nature se identifican alteraciones genéticas complejas incluyendo poliploidización, variaciones en el número de copias de determinados genes o eventos de cromotripsis, en muchas ocasiones adquiridas de forma simultánea más que gradual (Notta F *et al*, 2016).

En lo que respecta a otros genes, un estudio llevó a cabo la secuenciación de los exones codificantes de proteínas de más de 20,735 genes, identificando 1562 mutaciones somáticas en 1475 genes distintos al analizar el ADN de 24 adenocarcinomas de páncreas avanzados (Jones S *et al*, 2008).

Tras detectar 69 conjuntos de genes que estaban mutados en la mayoría de estas neoplasias, comprobaron como una importante proporción de ellos se podían agrupar en 12 vías y procesos moleculares relacionados con la progresión tumoral:

- Adhesión de la célula homofílica
- Apoptosis
- Control del daño del ADN
- Quinasa C-Jun N-terminal
- Regulación de la invasión
- Regulación de la transición de fase G₁/S
- Señalización de K-RAS
- Señalización de la vía Hedgehog
- Señalización de las integrinas
- Señalización de TGF- β
- Señalización de Wnt/Notch
- Señalización dependiente de GTPasa pequeña

4. RESISTENCIA AL TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Aunque inicialmente algunas neoplasias de páncreas puedan responder a las terapias antineoplásicas administradas, a veces consiguiéndose reducciones del volumen tumoral muy importantes, la práctica totalidad acabarán progresando y, en última instancia, provocando el fallecimiento del paciente. Es fundamental por este motivo explorar los diferentes mecanismos mediante los cuales las células de adenocarcinoma de páncreas se vuelven refractarias a los diferentes tratamientos, entre los cuales se incluye la utilización de vías de señalización que contrarrestan sus efectos, y así poder actuar a estos niveles y retrasar la evolución de la enfermedad.

4.1. PI3K/AKT/mTOR

Esta cascada de señalización comienza con la activación de PI3K a partir de diferentes moléculas, principalmente GPCR (*G protein coupled receptors*) y receptores tirosina-quinasa como HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) o IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*), tras el estímulo de factores de crecimiento como insulina/IGF. Sin embargo, alteraciones de función tanto a estos niveles como corriente abajo, afectando a AKT/PKB, a subunidades de PI3K o con la pérdida de función de PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), pueden favorecer la hiperactivación de la vía.

PI3K lleva a cabo la fosforilación de PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato) a PIP₃ (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato), y esto conduce a la traslocación de AKT del citoplasma a la membrana plasmática y su activación por PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase 1*) y mTORC2 (Roux PP *et al*, 2005). Una vez activada, AKT potencia la proliferación y supervivencia celular de forma directa, además de revertir la inhibición de mTORC1 mediada por TSC1/2 (*tuberous sclerosis complex 1/2*) y por PRAS40.

Rheb (*RAS homolog enriched in brain*) activo, es decir unido a GTP, es un potente activador de mTORC1. El heterodímero TSC1/2 actúa como proteína GTPasa de Rheb, y la fosforilación de TSC2 por AKT, o indirectamente a través de ERK/MAPK3 (*extracellular signal-regulated kinase 1/mitogen-activated protein kinase 3*), causa la disociación de estas dos moléculas y por consiguiente la activación de mTORC1.

Respecto a PRAS40, inicialmente se consideraba que era un sustrato únicamente de AKT, pero recientemente se ha identificado su papel también como componente y sustrato de mTORC1. La fosforilación de PRAS40 por AKT y por el propio mTORC1 causa su disociación de este último, desapareciendo la actividad inhibitoria que PRAS40 produce (Wiza C *et al*, 2012).

mTOR (*mammalian target of rapamycin*) consta de dos complejos proteicos distintos, mTORC1 y mTORC2, con funciones diferentes.

mTORC1 se compone de la proteína RAPTOR (*regulatory-associated protein of mTOR*) (Hara K *et al*, 2002), mLST8/GβL (*mammalian lethal with Sec 13 protein 8/G-protein β-protein subunit like*), PRAS40 (*AKT/PKB substrate 40 kDa*) y DEPTOR (*DEP-domain-containing mTOR interacting protein*) (Peterson PR *et al*, 2009). Controla la síntesis proteica, favorece la maduración de las células de la serie blanca hematopoyética y favorece el crecimiento celular y la proliferación mediante la activación de p70S6K (*ribosomal protein S6 kinase beta-1*), que fosforila rpS6 (*ribosomal protein S6*), e induce la disociación de 4E-BP1 de eIF4E (*eukaryotic translation initiation factor 4E*), necesario para la síntesis proteica.

Por su parte, mTORC2 incluye a las moléculas RICTOR (*rapamycin-insensitive companion of mTOR*) (Sarbasov DD *et al*, 2004), mSIN1 (*mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1*) (Yang Q *et al*, 2006), PROTOR 1/2 (*protein observed with rictor 1/2*) (Pearce LR *et al*, 2007), mLST8/GβL y DEPTOR. Este macrocomplejo se encarga de la regulación del citoesqueleto, del metabolismo celular, de la migración celular y la supervivencia celular mediante la interacción con AKT/PKB (*protein-kinase B*), SGK (*serum and glucocorticoid induced kinase*) y GTPasas de la familia Rho.

EGF (*epidermal growth factor*) también activa la señalización de mTORC1 de forma independiente al eje PI3K/AKT. La unión de este factor de crecimiento a EGFR (*epidermal growth factor receptor*) provoca la activación de la cascada de las MAPK, y consiguientemente la fosforilación tanto de TSC2 como de RAPTOR por ERK/MAPK3 y RSK (*40S ribosomal protein S6 kinase*) (Carrière A *et al*, 2008; Carrière A *et al*, 2011; Ma L *et al*, 2005; Roux PP *et al*, 2004) llevando a la activación de mTORC1.

En lo concerniente a la activación de mTORC2 y la subsiguiente fosforilación de AKT, PKCα o SGK1 a través de PI3K, todavía no se conocen las moléculas que causan este proceso, aunque sí

que hay datos que sugieren que se trate de una vía independiente de mTORC1.

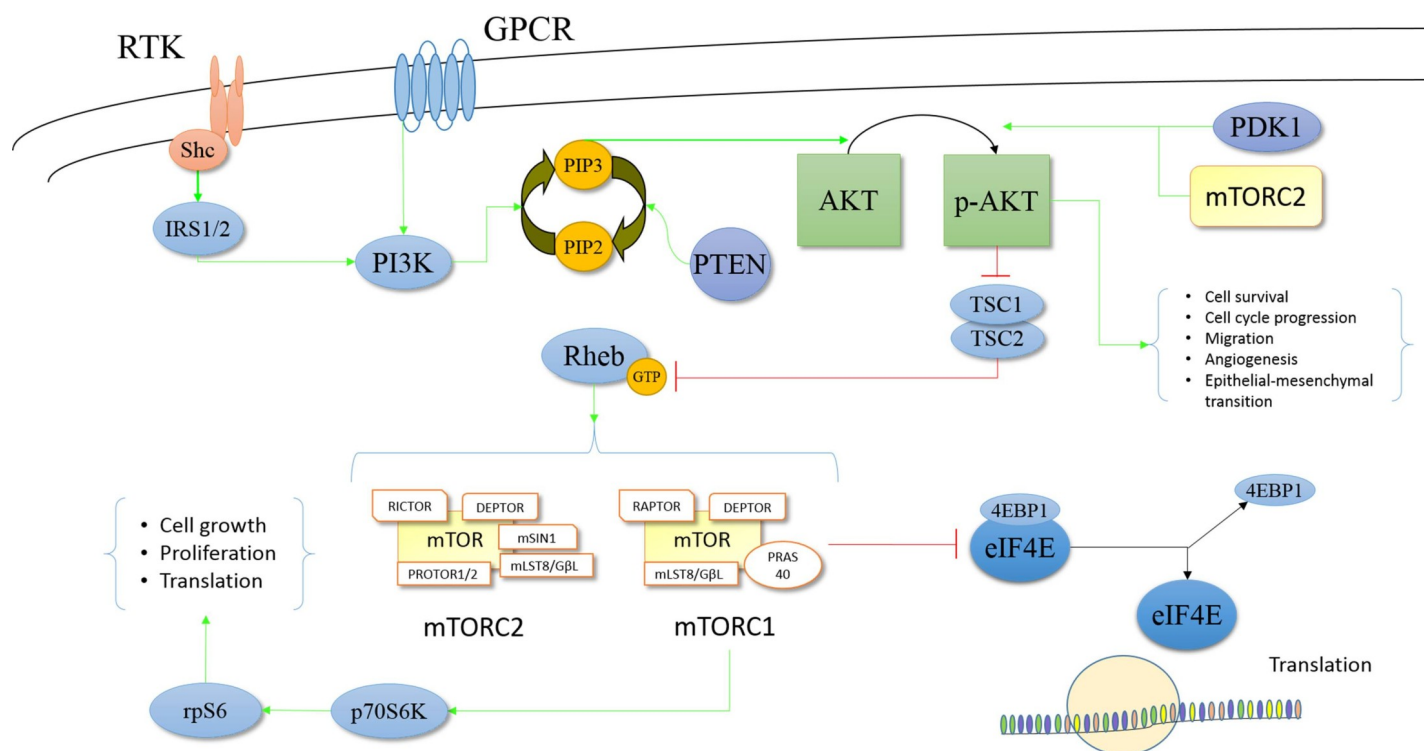


Figura 1. Esquema representando la estructura e interacciones de la vía PI3K/AKT/mTOR. RTK: receptor tirosinasa.

4.1.1. Señalización de autorregulación (*Feedback*) negativa

Se han descrito varios mecanismos de autorregulación negativa que controlan la señalización de mTOR. El silenciamiento o inhibición de la acción de diferentes moléculas puede provocar la abolición de dicha autorregulación negativa, favoreciendo así el escape celular mediante mecanismos que implican a distintas vías de proliferación y supervivencia.

mTORC1, mTORC2 y S6K1 inducen la degradación de IRS-1 (*insulin receptor substrate 1*), limitando la señalización por PI3K. mTORC1 y S6K1 lo hacen mediante fosforilación directa de IRS-1, mientras que mTORC2 fosforila Fbw7, una ubiquitina ligasa que degrada esta molécula (Harrington LS *et al*, 2004; Kim SJ *et al*, 2012; Shah OJ *et al*, 2004). La inhibición de mTOR provoca una fosforilación y activación de AKT por la pérdida de otro mecanismo de autorregulación, y este proceso es independiente de IGF1R (Shah OJ *et al*, 2004).

Grb10 (*growth-factor receptor-bound protein 10*) funciona como un supresor de tumores que limita la señalización de PI3K y de la vía de las MAPK; la fosforilación por mTORC1 la estabiliza y mantiene su función (Yu Y *et al*, 2011). Por último, S6K1 regula la actividad de mTORC2 mediante fosforilación directa de RICTOR o mSin1, impidiendo así la correcta asociación y funcionamiento del complejo mTORC2. También AKT disminuye la actividad de mTORC2 mediante fosforilación directa de mSin1 (Julien LA *et al*, 2010; Kalender A *et al*, 2010; O'Reilly KE *et al*, 2006; Soares HP *et al*, 2013).

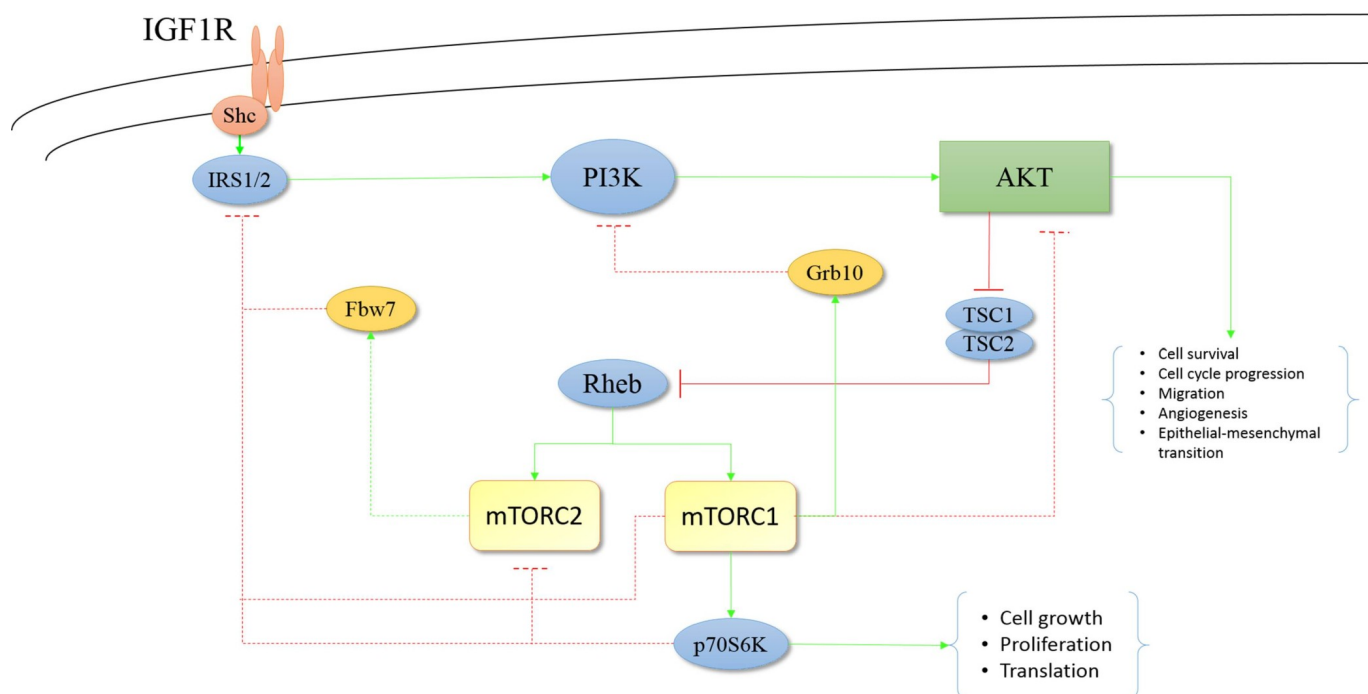


Figura 2. Principales rutas de autorregulación negativa descritas dentro de la vía PI3K/AKT/mTOR. Línea continua: interacciones habituales corriente-abajo entre las proteínas de la vía de señalización. Línea discontinua: rutas de señalización negativa.

4.1.2. Tratamientos dirigidos contra PI3K/AKT/mTOR

Varios estudios preclínicos han centrado su investigación en la vía PI3K/AKT/mTOR, debido a su estrecha relación con otras rutas moleculares de gran importancia, y su contribución a la oncogénesis y progresión tumoral en múltiples cánceres.

El trabajo de Soares HP *et al.* evidenció cómo la supresión de mTORC1 mediante inhibidores alostéricos (rapamicina, everolimus) previene la fosforilación inhibitoria y degradación de IRS-1, aumentando así la actividad de PI3K y AKT. A diferencia de rapamicina y everolimus, los inhibidores del sitio activo suprimieron también la fosforilación de AKT en Ser⁴⁷³, lo que concuerda con el hecho de que mTORC2 sea la principal quinasa que actúa en esa posición, y potenciaron la activación de ERK. El silenciamiento de IGF1R previno la fosforilación de AKT secundaria al tratamiento con inhibidores de mTOR (Soares HP *et al.*, 2013).

Además, puso de manifiesto los efectos antitumorales de metformina, un tratamiento utilizado habitualmente en la diabetes mellitus por la estimulación de AMPK de forma indirecta. AMPK es un sensor de energía celular que se activa cuando los niveles de ATP son bajos y hay un aumento de la concentración de 5'AMP, mientras que metformina reduce la síntesis de ATP mediante la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Una vez activado, AMPK bloquea mTOR a tres niveles: estimula la función de TSC2 mediante la fosforilación de la Ser¹³⁴⁵, fosforila RAPTOR de forma directa y fosforila IRS-1 de forma directa. De esta forma, metformina anula la actividad de mTORC1 sin desencadenar mecanismos de escape a través de AKT y ERK. AMPK también inhibe rutas relacionadas con los receptores tirosina cinasa, entre ellos EGFR y ErbB2, que activan ERK, mTOR y Akt corriente abajo.

También se ha descrito la inhibición de la señalización a través de mTOR provocada por metformina utilizando vías independientes de AMPK, como por ejemplo las GTPasas Rag (Kalender A *et al.*, 2010) o REDD1 (Ben Sahra I *et al.*, 2008).

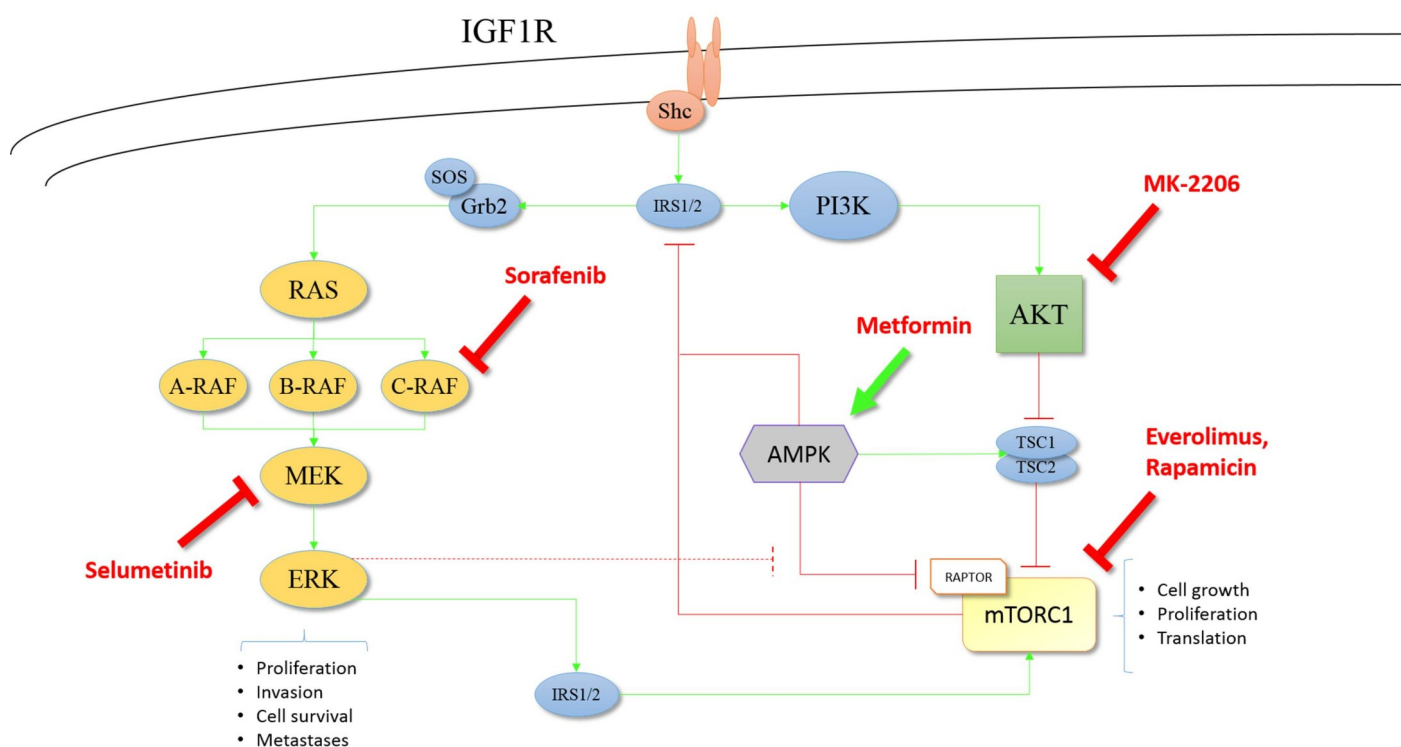


Figura 3. Representación esquemática de las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/ERK, su interrelación, y lugar de actuación de las moléculas mencionadas en el apartado correspondiente.

El equipo de Wei *et al.* comprobó como las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas con mutación de K-RAS eran resistentes a la inhibición de mTOR por everolimus, mientras que aquellas líneas sin activación constitutiva de K-RAS eran sensibles a este tratamiento. La administración de everolimus provocaba además una hiperactivación de la vía de las MAPK únicamente en presencia de K-RAS mutado, lo que sugiere que la activación constitutiva de K-RAS proporciona un mecanismo de escape tumoral a la inhibición de la vía PI3K/AKT/mTOR; de hecho, el silenciamiento de K-RAS mediante horquillas de ARN pequeñas, o shRNAs (*short-hairpin RNAs*), disminuyó la resistencia a everolimus y la hiperactivación de la vía de las MAPK en las líneas celulares con mutación de K-RAS, mientras que no cambió de forma significativa la respuesta en células con el gen K-RAS no mutado.

Sorafenib, un inhibidor de quinasas de amplio espectro que actúa a nivel de C-RAF, no inhibió el crecimiento de las líneas celulares de adenocarcinoma de páncreas independientemente del estado mutacional de K-RAS. Sin embargo, en combinación con everolimus disminuyó la resistencia a este fármaco en células con el gen K-RAS mutado.

Por último, este estudio también demostró el papel fundamental de IGF-1R en el escape tumoral a

los tratamientos. En células con mutación de K-RAS, el silenciamiento de IGF-1R disminuye los mecanismos de autoregulación de la activación de ERK y AKT tras la inhibición de mTOR (Wei F *et al*, 2012).

La eficacia de fármacos que actúan a diferentes niveles de esta vía molecular se ha evaluado en varios ensayos clínicos, y los resultados parecen concordar con lo descrito *in vitro*. La inhibición de mTOR por everolimus en un estudio clínico de fase II en carcinoma de páncreas metastásico en progresión a gemcitabina no consiguió respuesta al tratamiento, y tan solo un 21% de los pacientes mantuvo estabilidad de la enfermedad a los 2 meses del inicio del tratamiento (Wolpin BM *et al*, 2009). Otros dos estudios de fase II con temsirolimus y everolimus no detectaron efecto antitumoral, y la mediana de supervivencia de los pacientes fue de unos 6 meses (Javle MM *et al*, 2010).

El inhibidor de AKT MK-2206 y el inhibidor de MEK1/MEK2 selumetinib se combinaron en un estudio clínico de fase II en pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico refractario a tratamiento basado en gemcitabina, obteniendo peores resultados que mFOLFOX en cuanto a SG (Iriana S *et al*, 2016).

Por último, dos estudios fase II en pacientes con adenocarcinoma de páncreas metastásico no detectaron actividad relevante con la administración de sorafenib ni de sorafenib en combinación con gemcitabina (El-Khoueiry AB *et al*, 2012; Kindler HL *et al*, 2012).

4.1.3. Función diferencial de las isoformas de AKT en señalización intracelular

AKT/PKB (*v-akt murine thymoma viral oncogene homologue*) está compuesta por 3 isoformas altamente homólogas. Tienen una estructura común, con un dominio catalítico flanqueado por un motivo PH (pleckstrin homology) amino-terminal y un dominio carboxi-terminal regulador. Entre el dominio PH y el núcleo de la quinasa catalítica hay una región α -helicoidal de función desconocida. Se activan mediante la unión de PIP₃ al dominio PH, lo que produce la relocalización de AKT en la membrana plasmática y un cambio conformacional que lleva a la exposición del dominio catalítico. Esto permite la fosforilación de AKT por sus quinasas activadoras PDPK1 (*3-Phosphoinositide Dependent Protein Kinase 1*) y mTORC2.

AKT ejerce diferentes funciones. Promueve la supervivencia celular al inducir la expresión de los genes *c-myc* y *Bcl-XL* mediante la activación de NF- κ B, mientras que inhibe factores de transcripción que favorecen la expresión de proteínas pro-apoptóticas como BAD (*Bcl-2-associated death promoter*). Fomenta además la progresión del ciclo celular en fase G₁ y G₂ al inducir la traducción de ciclina D1 a través de mTORC1 y a la vez impedir su inactivación mediante la inhibición de GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*) (Takahashi-Yanaga F *et al*, 2008). También promueve la migración celular mediante la interacción con otros componentes del citoesqueleto, y favorece la angiogénesis patológica.

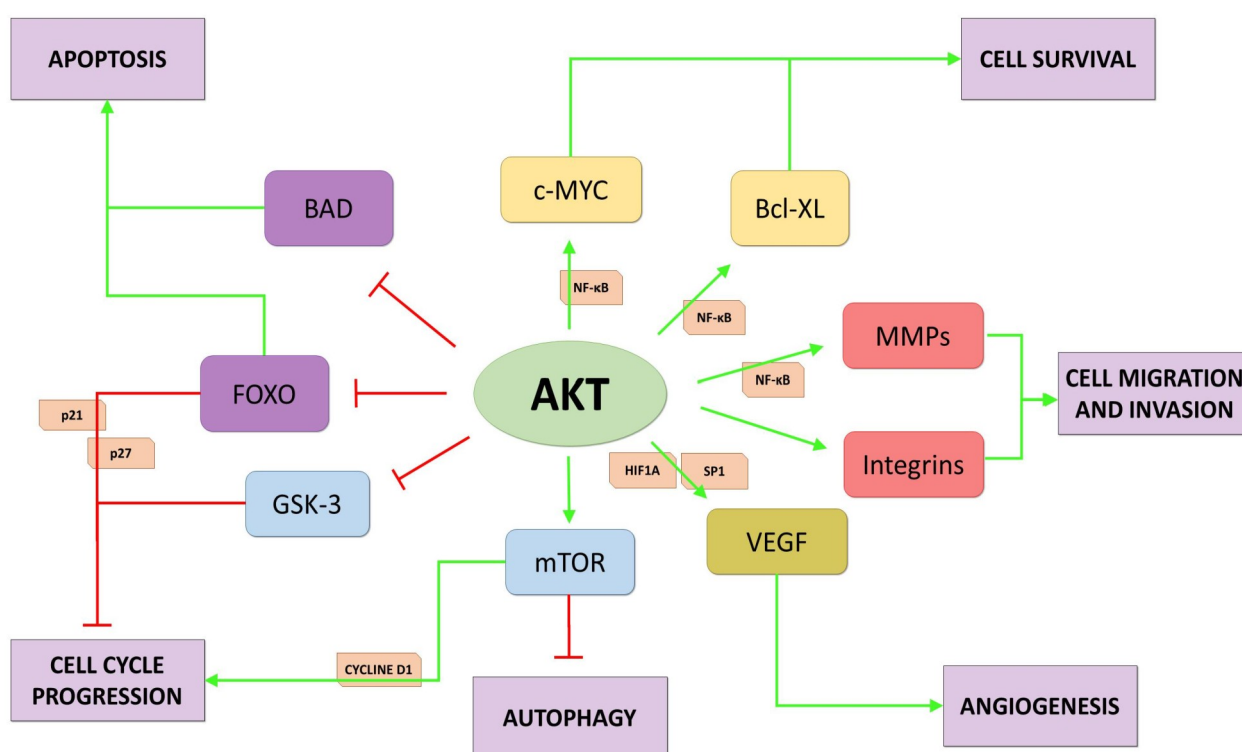


Figura 4. Representación esquemática de las interacciones y funciones asociadas con AKT

Las isoformas de AKT están codificadas por tres genes diferentes: *AKT1* (*PKB α*), *AKT2* (*PKB β*) y *AKT3* (*PKB γ*). La expresión de los genes *AKT1* y *AKT2* se distribuye por todo el organismo, mientras que *AKT3* se expresa preferentemente en tejido neuronal (Chin YR *et al*, 2009). Inicialmente se consideró que sus funciones eran redundantes debido a la alta homología entre las isoformas, pero en los últimos años se han publicado estudios que apoyan que cada isoforma tiene un papel específico en el cáncer, y que puede variar en función del tipo tumoral.

Se han identificado mutaciones somáticas activadoras de *AKT1* en cáncer de mama, colorrectal, ovárico, pancreático y de próstata, lo que se relaciona con alto grado y estadios avanzados de la enfermedad (Brown JS *et al*, 2016; Carpten JD *et al*, 2007; Sun M *et al*, 2001). En dos modelos de cáncer de pulmón con ratones *knockout* (con el gen delecionado) para cada una de las isoformas de AKT, la deficiencia de AKT1 retrasó la tumorigénesis y progresión, mientras que la ablación de AKT2 y AKT3 aceleró el crecimiento por aumento de proliferación y disminución de apoptosis (Linnerth-Petrik NM *et al*, 2014; Hollander MC *et al*, 2011). En células de fibrosarcoma, AKT1 favoreció la invasión mediante la activación de MMP9 y un aumento de la motilidad celular (Kim D *et al*, 2001). La actividad pro-tumorigénica de AKT1 se ha confirmado en estudios de cáncer de mama utilizando ratones *knockout*. En dos modelos de cáncer de mama inducidos por ErbB2 se observó un retraso del crecimiento tumoral y una menor incidencia de metástasis pulmonares en ratones con deficiencia de AKT1 (Ju X *et al*, 2007; Maroulakou IG *et al*, 2007). J.N. Hutchinson *et al*. describieron una aceleración de la velocidad de aparición de tumores de mama en ratones transgénicos co-expresando AKT1 y ErbB2 en comparación con sólo ErbB2. La co-expresión de AKT1 se asoció con mayor proliferación celular, aunque también con una menor incidencia de metástasis (Hutchinson JN *et al*, 2004). En el caso de AKT2, este mismo grupo demostró que la co-expresión junto con HER2 en ratones transgénicos no redujo el tiempo de aparición de cáncer de mama pero sí incrementó el desarrollo de metástasis pulmonares (Dillon RL *et al*, 2009). Por último, una expresión reducida de AKT1 previno el desarrollo espontáneo de diferentes tumores en ratones con delección heterocigótica en *PTEN* (ratones *PTEN* +/-) sugiriendo un papel regulador negativo de PTEN sobre las capacidades pro-carcinogénicas de AKT1 (Chen ML *et al*, 2006).

Sorprendentemente, varios estudios han mostrado que AKT1 bloquea la motilidad celular y la invasión en carcinoma epitelial de mama (Irie HY *et al*, 2005; Liu H *et al*, 2006; Yoeli-Lerner M *et al*, 2005). Hasta la fecha se han descrito 3 mecanismos moleculares. El primero de ellos depende de la degradación de NFAT por el proteasoma citoplasmático 26S (Yoeli-Lerner M *et al*, 2005). H.Y. Irie *et al* describieron también una vía dependiente de ERK, detectando efectos radicalmente diferentes tras el silenciamiento de AKT1 o AKT2 mediante shRNA en un cultivo 3D con hiperestimulación de IGF1R. La ablación de ambas isoformas redujo la proliferación celular; sin embargo, el silenciamiento de AKT1 estimuló la migración y la transición epitelio-mesenquimal mediante un mecanismo relacionado con ERK y con la disminución de la expresión de E-caderina, mientras que la expresión reducida de AKT2 suprimió la migración celular y no tuvo efecto sobre la

activación de ERK (Irie HY *et al*, 2005). Un tercer mecanismo asocia fosforilación y degradación de TSC2, descubriendo así una función pro-tumorigénica anteriormente desconocida de esta proteína (Liu H *et al*, 2006).

En un modelo *in vitro* de cáncer de próstata, el silenciamiento de *AKT1* y *AKT2* pero no el de *AKT3* indujo migración, adhesión e invasión mediante la activación de $\beta 1$ -integrinas. Sin embargo, los mecanismos para conseguir este efecto fueron radicalmente diferentes para cada isoforma; El silenciamiento de *AKT1* causó la abolición de un mecanismo autoregulatorio negativo, y por lo tanto potenció la expresión de receptores tirosina-quinasa como EGFR o MET, relacionados con la invasión tumoral, mientras que el aumento de la invasión inducido por la reducción en la expresión de *AKT2* fue dependiente de miR-200 (Virtakoiyu R *et al*, 2012).

Asimismo, se ha demostrado *in vitro* que la expresión de genes *AKT1* y *AKT2* constitutivamente activos mediante transfección en células de cáncer de páncreas inducía un mayor potencial invasivo (Tanno S *et al*, 2001).

También se ha puesto de manifiesto recientemente la importancia de AKT en el mantenimiento de las células iniciadoras tumorales, también conocidas como células madre cancerosas (CMCs). Se hipotetiza que esta subpoblación de células mantiene la capacidad oncogénica y de adaptación de los tumores, y que las características de las CMCs están íntimamente relacionadas con la transición epitelio-mesénquima (Mani SA *et al*, 2008; Morel AP *et al*, 2008). En un modelo *in vitro* de cáncer de mama se objetivó cómo el silenciamiento de *AKT1* provocó una importante reducción de CMCs. La supervivencia de las CMCs, así como el mantenimiento de su fenotipo de transición epitelio-mesenchimática, depende de la vía molecular *AKT1/FoxO3(Forkhead box protein 3)/Bim (Bcl-2 interacting mediator of cell death)* (Gargini R *et al*, 2015). De la misma forma, un trabajo *in vitro* de M. Escoll *et al* demostró cómo *AKT2* tiene también un papel fundamental en la supervivencia y funcionalidad de las CMCs en gliomas, aunque por una vía molecular que incluye *WASP-interacting protein (WIP)* y *YAP/TAZ (Yes-associated protein 1/Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif)*. Obtuvieron resultados comparables en células de cáncer de mama, confirmando así que estos datos pueden ser extrapolables a otros tumores (Escoll M *et al*, 2017).

ESTADO DE LA CUESTIÓN

ISOFORM	AUTHOR	CANCER TYPE	FUNCTION	ISOFORM	AUTHOR	CANCER TYPE	FUNCTION
AKT1	Linnerth-Petrik NM Hollander MC	Lung Cancer	Tumorigenesis Progression	AKT2	Linnerth-Petrik NM	Lung Cancer	Anti-proliferative Pro-apoptotic
	Kim D	Fibrosarcoma	Invasion Cell migration		Dillon RL	Breast Cancer (HER-2)	Metastases
	Ju X Maroulakou IG Hutchinson JN	Breast Cancer (HER-2)	Tumor growth Metastases Tumorigenesis		Irie HY Escoll M Cheng GZ	Breast Cancer	Proliferation Invasion Cell migration Survival TICs maintenance
	Chen ML	Endometrium, Prostate, Thyroid, Adrenal Medulla	Tumorigenesis		Virtakoivu R	Prostate Cancer	Anti-migration Anti-invasive Anti-adhesive
	Irie HY Liu H Yoeli-Lerner M Gargini R	Breast Cancer	Proliferation Invasion Anti-motility Anti-EMT TICs maintenance		Tanno S Altomare DA Cheng JQ	Pancreatic Cancer	Tumorigenesis Invasion Tumor growth
	Virtakoivu R	Prostate Cancer	Anti-migration Anti-invasive Anti-adhesive		Arboleda MJ	Ovarian Cancer	Tumorigenesis Metastases
	Tanno S	Pancreatic Cancer	Invasion		AKT3	Davies MA	Malignant Melanoma
			Chin YR	Breast Cancer (triple negative)		Tumor growth	
			Linnerth-Petrik NM	Lung Cancer		Anti-proliferative Pro-apoptotic	

Figura 5. Tabla que recoge los principales estudios preclínicos que evalúan las funciones individuales de cada una de las isoformas de AKT en neoplasias de diferentes orígenes.

La amplificación y/o sobreexpresión de AKT2 es frecuente en el cáncer humano, y se ha detectado en el 10-20% de las neoplasias, incluyendo los cánceres de útero, páncreas, mama, ovario, pulmón, colorrectal y vejiga (Brown JS *et al*, 2016; Cheng JQ *et al*, 1992 y 1996; Roy HK *et al*, 2002). Sin embargo, la evidencia experimental *in vivo* indica que la interferencia con la expresión de AKT2 no es tan efectiva como la de AKT1 en cuanto al retraso del desarrollo de estas neoplasias, como se vio en un modelo de ratones transgénicos *PTEN +/-*. Curiosamente, sí disminuyó la incidencia de tumores tiroideos (Xu PZ *et al*, 2012).

La sobreexpresión de AKT2 en células de cáncer de mama y de ovario causó un incremento de adhesión, invasión y potencial metastásico mediante la inducción de la expresión de beta-integrinas, no así con la sobreexpresión de AKT1 y AKT3. En el trabajo de M. J. Arboleda *et al*. se confirmó también *in vivo* el aumento del potencial metastásico inyectando células de cáncer de ovario modificadas en ratones *nude* inmunodeficientes, mientras que la expresión de un mutante dominante negativo de *AKT2* sin actividad quinasa disminuyó la tumorigénesis y metástasis (Arboleda MJ *et al*, 2003). El estudio de G. Z. Cheng GZ *et al*. en células de cáncer de mama apoya el papel de AKT2 en invasión y supervivencia en esta neoplasia (Cheng GZ *et al*, 2007). En las

células de adenocarcinoma de páncreas PanC1 y AsPC1, el silenciamiento de *AKT2* redujo la tumorigénesis, el crecimiento y la invasión *in vitro* y en un modelo de xenotransplante en ratones *nude* inmunodeficientes (Altomare DA *et al*, 2005; Cheng JQ *et al*, 1996).

Por último, los estudios realizados con la isoforma *AKT3* parecen indicar que no está relacionada con la regulación del metabolismo, pero sí en el desarrollo neurológico (Easton RM *et al*, 2005). Sin embargo, su hiperactivación se ha detectado en melanoma, carcinoma de próstata hormonoresistente y carcinoma de mama sin receptor hormonal (Davies MA *et al*, 2008; Nakatani K *et al*, 1999; Stahl JM *et al*, 2004).¹⁴⁹⁻¹⁵¹ Estos resultados sugieren que pueda tener un papel en la biología de la célula cancerosa. De hecho, la supervivencia celular y el crecimiento tumoral en melanoma fueron dependientes de su actividad, puesto que el silenciamiento de la expresión de *AKT3* provocó apoptosis e inhibió progresión tumoral en un modelo de ratón *nude* (Davies MA *et al*, 2008). Asimismo, el silenciamiento de *AKT3* inhibió el crecimiento de las células cancerosas en un modelo 3D de carcinoma de mama triple negativo y también en xenotransplante en ratones. Este efecto era dependiente de la sobreexpresión de p28, y de hecho, el bloqueo de ésta proteína revertió los efectos anti-pro-carcinogénicos del silenciamiento de *AKT3*. Las células de cáncer de mama con *AKT3* silenciado adquirieron una mayor sensibilidad frente a fármacos inhibitorios de pan-AKT. Curiosamente, el silenciamiento de *AKT1* y *AKT2* tuvo un efecto mucho más modesto en el crecimiento del modelo 3D de cáncer de mama triple negativo (Chin YR *et al*, 2014).

Estos datos indican en conjunto que la contribución de las tres isoformas a la biología de la célula cancerosa está regulada específicamente, y que *AKT3* juega un papel nada desdeñable en la misma.

5. METABOLISMO MITOCONDRIAL Y CÁNCER

Las células cancerosas presentan frecuentemente un aumento de la glicolisis y de la producción de lactato en comparación con células normales, independientemente de la disponibilidad de oxígeno en el medio. A este fenómeno se le denomina glicolisis aeróbica o efecto Warburg, y permite obtener energía e intermediarios más rápidamente que a través de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, para así poder cubrir las altas exigencias metabólicas de células rápidamente proliferativas (Koppenol WH *et al*, 2011; Warburg O *et al*, 1956; Weinberg SE *et al*, 2015). Esto extendió la idea de que las mitocondrias de las células tumorales eran disfuncionales, hasta que

recientemente se ha demostrado que la función mitocondrial es fundamental en el cáncer y, de hecho, el ciclo de Krebs tiene una actividad similar en células cancerosas y en células normales (Fogal V *et al*, 2010; Weinberg F *et al*, 2010). Además de la producción de energía, las mitocondrias también regulan la supervivencia a través de señales de apoptosis y autofagia, y el metabolismo lipídico. Esto ha posicionado el metabolismo mitocondrial como una diana terapéutica de alto interés en cáncer, y se está evaluando en múltiples ensayos preclínicos y clínicos.

5.1. Funciones de la mitocondria

Además de regular la producción de energía, la mitocondria participa globalmente en el metabolismo celular mediante la producción de intermediarios moleculares y en señalización intracelular. Así, tiene una función determinante tanto anabólica como catabólica (Chandel NS *et al*, 2014).

5.1.1. Producción de energía y biosíntesis

La glicolisis se produce en el citosol, y tiene dos fases diferenciadas. La primera fase es de gasto energético y tiene como objetivo la degradación de una molécula de glucosa en 2 de gliceraldehído utilizando 2 moléculas de adenosín trifosfato (ATP). La segunda fase es de obtención de energía y la primera reacción de esta fase está catalizada por la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). En esta fase se transforman dos moléculas de gliceraldehído en 4 de piruvato, generando 4 moléculas de ATP.

Las etapas posteriores vienen determinadas por las condiciones del medio:

- Si el medio es aeróbico se produce la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Se obtienen hasta 30 moléculas de ATP a partir de una molécula de glucosa.
- Si el medio es anaeróbico, el piruvato es oxidado por la enzima lactato deshidrogenasa, generando lactato en el proceso denominado glicolisis anaeróbica. Este proceso es poco eficiente, obteniéndose 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa.

Además del piruvato, la mitocondria produce energía a partir de otros elementos como ácidos grasos o aminoácidos, principalmente la glutamina. La β -oxidación de los lípidos produce acetil-CoA, pudiendo entrar en el ciclo de Krebs en la matriz mitocondrial para generar energía. De la misma manera, el piruvato se oxida generando moléculas de acetil-CoA por la piruvato deshidrogenasa (PDH), liberando NADH y CO₂. La enzima PDH es inhibida por fosforilación por la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), y reactivada por la piruvato deshidrogenasa fosfatasa (PDP).

Las moléculas de acetil-CoA entran en el ciclo de Krebs, y son utilizadas por la enzima citrato sintasa (CS) junto a oxaloacetato para generar citrato. Este compuesto se transforma en repetidas ocasiones durante el ciclo, obteniéndose isocitrato, α -cetoglutarato, succinil-CoA, succinato, fumarato, malato y oxaloacetato, pudiendo este último reutilizarse para comenzar nuevamente el ciclo. Estas reacciones bioquímicas las llevan a cabo las enzimas aconitasa, isocitrato deshidrogenasa (IDH2/3), α -cetoglutarato deshidrogenasa (α KDH), succinil-CoA sintasa (SCS), succinato deshidrogenasa (SDH), fumarato hidratasa (FH) y malato deshidrogenasa (MDH). Durante este proceso se genera NADH (mediante las enzimas IDH3, α KDH y MDH), necesario para la producción de energía, y FADH₂ (mediante la enzima SDH) y NADPH (mediante la enzima IDH2), que participan en biosíntesis y reacciones redox. El succinyl-CoA puede ser utilizado por la ácido δ -aminolevulinico (ALA) sintetasa (ALAS) junto a glicina para generar ALA, que a su vez es fundamental en la síntesis del grupo hemo (Wallace DC *et al*, 2012).

5.1.2. Señalización

Al recibir estímulos proliferativos las células deben superar un punto de regulación metabólico mitocondrial antes de activar los programas transcripcionales. Las mitocondrias se comunican estructuralmente y funcionalmente con el resto de compartimentos celulares de dos maneras:

- Anterógrada:

Consiste en la transducción de señales del citosol a la mitocondria. Cuando aumentan los niveles de catión de calcio (Ca^{+2}) libre en el citosol, éste es secuestrado en la matriz mitocondrial activando varias enzimas del ciclo de Krebs.

- Retrógrada:

Consiste en la señalización desde la mitocondria al citosol para producir cambios en el funcionamiento de la célula. Esto incluye la liberación de citocromo C como inductor de apoptosis dependiente de caspasa 9, de AIF para inducir apoptosis independiente de caspasas, de metabolitos reactivos de oxígeno (*reactive oxygen species*, ROS) capaces de modificar la función de determinadas proteínas, o de inducir expresión génica o la producción de metabolitos como el citrato, que puede regular la acetilación proteica una vez metabolizado por la ATP citrato-liasa en acetil-CoA y oxaloacetato. También la respuesta inmunológica está relacionada con las mitocondrias, dado que proteínas de señalización antivíricas mitocondriales (MAVS) se encuentran en la membrana externa mitocondria, y tienen un papel relevante en la detección de moléculas derivadas de patógenos (Chandel NS *et al*, 2014).

5.2. Crecimiento tumoral

Una de las características iniciales de las células tumorales es la presencia de alteraciones bioenergéticas y metabólicas (Ward PS *et al*, 2012). Por ejemplo, la potenciación de la glicolisis como consecuencia de la desregulación de vías de señalización como la de *PI3K*, y la activación de

ESTADO DE LA CUESTIÓN

oncogenes como *c-Myc* o *RAS*. Concretamente, se sobreexpresan los transportadores de glucosa para aumentar su absorción (Bhat TA *et al*, 2015), lo cual supone una gran ventaja para la célula tumoral por los siguientes motivos:

- La producción de ATP por glicolisis es mucho más rápida que por fosforilación oxidativa. Esto supone una ventaja para las células tumorales en cuanto a crecimiento y proliferación.
- Favorece la biosíntesis, al conseguir un aporte continuo de intermediarios para vías como la de las pentosas fosfato, síntesis de ácidos grasos, entre otras.
- Consigue sustratos para la cadena de electrones mitocondrial
- Aumenta la producción de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato. NADPH es un agente reductor para la síntesis de lípidos, nucleótidos y aminoácidos.

La mayor parte de las células tumorales producen grandes cantidades de lactato a partir de piruvato independientemente de la disponibilidad de O₂. El lactato es un factor pronóstico de metástasis y de menor supervivencia, favorece la migración celular, se asocia con la radiorresistencia y estimula la secreción de factor de crecimiento del endotelio vascular (*vascular-endothelial growth factor*, VEGF), potenciando el crecimiento y diseminación del tumor (Hirschhaeuser F *et al*, 2011; Vander Heiden MG *et al*, 2009).

Esta potenciación de la glicolisis no implica un deterioro de la función mitocondrial, sino una adaptación al microambiente tumoral que favorece la proliferación tumoral (Weinberg F *et al*, 2010). Como consecuencia del metabolismo oxidativo se producen grandes cantidades de ROS. Los ROS activan varias vías de señalización asociadas con estrés oxidativo que promueven la proliferación celular y tumorigénesis, mientras que si los niveles son excesivos se produce muerte celular. Cuando el estrés oxidativo es bajo, la enzima piruvato quinasa muscular 2 (PKM2) se activa, metabolizando la glucosa a piruvato y lactato para generar ATP. Al contrario, si el stress oxidativo es alto, la enzima PKM2 permanecerá inactiva y la glucosa-6-fosfato se utilizará en la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH (Wallace DC *et al*, 2012). Asimismo, las células cancerosas generan grandes cantidades de NADPH en la mitocondria y en el citosol para mantener una actividad antioxidativa alta y contrarrestar el aumento de la producción de ROS.

Dada la ineficacia de la fosforilación oxidativa en las células cancerosas, también necesitan

recuperar intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para la síntesis de macromoléculas. De esta manera, las células cancerosas adquieren adicción a varias macromoléculas como la glutamina. Ésta se oxida para generar α -cetoglutarato que posteriormente se transforma en oxaloacetato a través del ciclo TCA que se puede combinar con acetil-CoA para obtener otra molécula de citrato. De esta manera se mantiene la función mitocondrial mientras se deriva la glucosa a la glicolisis y se utiliza citrato para la síntesis de macromoléculas.

5.2.1. Regulación de glicolisis en la célula cancerosa

a) HIF-1 α

En condiciones de normoxia la proteína Von Hippel-Lindau degrada mediante ubiquitinización al factor de transcripción asociado a la hipoxia HIF-1 α , mientras que en situación de hipoxia no se degrada. Además, esta molécula se sobre-expresa en múltiples neoplasias humanas (Zhong H *et al*, 1999). HIF-1 α transactiva la transcripción de múltiples genes relacionados con angiogénesis, como la *eritropoyetina*, *VEGF*, *PDGF- β* , entre otros, además de potenciar la glicolisis.

La glicolisis se estimula mediante la producción directa de transportadores de glucosa (GLUT), y enzimas glicolíticas como hexoquinasa II (HKII), piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1) o PKM2. PDK1 inhibe a PDH, impidiendo la generación de acetil-CoA a partir de piruvato, y así evitando su entrada en el ciclo TCA. Esto favorece la oxidación de piruvato a lactato. En células con delección o silenciamiento de HIF-1 α , la expresión de PDK1 aumenta los niveles de ATP, limita la generación de ROS y rescata a las células de la apoptosis inducida por hipoxia. Adicionalmente, la HKII se transloca a la mitocondria donde se une al canal de aniones voltaje dependiente (VDAC) y fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato. De esta manera se deriva el flujo de carbono hacia la glicolisis o hacia la vía de las pentosas fosfato (Kim JW *et al*, 2006). En cáncer colorrectal, la inhibición de PDK aumenta la actividad de PDH, lo que induce un aumento del flujo de carbono hacia la fosforilación oxidativa acompañado de disminución de la proliferación celular, arresto del ciclo celular en G2/M y aumento de la apoptosis (Lu CW *et al*, 2008).

b) PI3K/AKT/mTOR

La activación de AKT en las células cancerosas potencia la glicolisis aeróbica, aumenta el consumo de glucosa y la producción de lactato, sin modificar la fosforilación oxidativa en mitocondrias (Elstrom RL *et al*, 2004). Este aumento de la glicolisis en situación de normoxia depende de la activación de HKII, GLUT1 y fosfofructokinasa 2 (PFK2), además de la fosforilación e inactivación del complejo de la esclerosis tuberosa 2 (TSC2), un supresor tumoral que regula negativamente mTOR.

A su vez, mTOR induce la expresión de enzimas glicolíticas a través de la activación de los factores de transcripción HIF-1 α , NF- κ B y c-Myc. Los factores de transcripción HIF-1 α y c-Myc a su vez estimulan PKM2. Esta molécula se encuentra sobre-expresada en la mayor parte de los tumores y, además de ser la responsable de catalizar el último paso de la glicolisis, promueve la actividad de HIF-1 α en el reclutamiento del coactivador transcripcional p300. Se establece entonces una vía autoreguladora positiva entre HIF-1 α y PKM2, dado que cada una de estas moléculas favorece la actividad de la otra (Dong G *et al*, 2016). Un estudio preclínico llevado a cabo por S. Jiang *et al*. en carcinoma no-microcítico de pulmón demostró la dependencia de la glicolisis tanto de mTOR como de AKT, y la sinergia entre terapias dirigidas frente a mTORC1/2 e inhibidores de la glicolisis (Jiang S *et al*, 2015).

c) c-Myc

Además de potenciar la actividad de PKM2, y por lo tanto la autorregulación positiva de HIF-1 α , Myc acentúa también la glutaminólisis mediante la activación de la enzima glutaminasa. De esta manera, el glutamato se oxida a α -cetoglutarato, que es utilizado por el ciclo TCA para generar oxaloacetato y así reponer el utilizado para la síntesis de citrato. Dado que la función de PDH está bloqueada por PDK1, de esta forma se puede mantener la funcionalidad del ciclo TCA sin necesitar piruvato. Este proceso se da con frecuencia en los tumores malignos y vuelve a las células cancerosas dependientes de glutamina (Bhat TA *et al*, 2015; DeBerardinis RJ *et al*, 2007; Wise DR *et al*, 2008).

d) K-RAS

Además de HIF-1 α , c-Myc y AKT, se ha comprobado que también la transformación oncogénica por K-RAS afecta al metabolismo mitocondrial sin alterar la expresión a partir del ADN mitocondrial (mtADN). La vía de *K-RAS* disminuye la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial dependiente de la desestabilización del complejo respiratorio I, ocasionando una potenciación de la glicolisis y un aumento de la producción de ROS (Chiaradonna F *et al*, 2006 1 y 2; Hu Y *et al*, 2012). De hecho este efecto podría ser causado por una asociación directa de la proteína RAS con la mitocondria, como sugiere el estudio dirigido por Y. Hu *et al*.

5.2.2. Defectos en enzimas mitocondriales

El desarrollo de algunas neoplasias también se ha asociado a la adquisición de varias mutaciones inactivadoras en genes mitocondriales. Por ejemplo, se han detectado mutaciones en el complejo respiratorio II (SDH) y en SDHAF2 en feocromocitomas y paragangliomas (Bardella C *et al*, 2011). SDH se encuentra en la membrana mitocondrial interna. Participa tanto en el ciclo TCA como en la cadena respiratoria mitocondrial. Está compuesta por cuatro subunidades, SDHA, SDHB, SDHC y SDHD, cuyo ensamblaje requiere la participación de dos factores, SDHAF1 y SDHAF2. La inhibición de la actividad de estas moléculas aumenta los niveles citosólicos y mitocondriales de succinato. Esto bloquea la actividad de las prolin-hidroxilasas (PHDs) α -cetoglutarato-dependientes, causando una estabilización de HIF1 α y su translocación al núcleo. HIF1 α también puede estabilizarse por el aumento de ROS por parte del complejo mitocondrial III, teniendo en cuenta que la inhibición de SDHB produce este efecto en las células (Guzy RD *et al*, 2008).

La mutación inactivadora en ambos alelos del gen *FH* se asocia con el síndrome de leiomiomatosis hereditaria y carcinoma de células renales (Picaud S *et al*, 2011). FH se encarga de la transformación de fumarato a malato. Las células afectadas tienen un descenso marcado de citrato y malato, obtenidas a partir de este punto del ciclo TCA, mientras que producen elevadas cantidades de fumarato y succinato.

La vía de respuesta a stress está regulada por la proteína NRF2 (*NFE2-related factor 2*). En condiciones normales, los niveles de NRF2 son bajos por degradación por KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) y por el complejo ubiquitin-ligasa 3. El exceso de fumarato inactiva

KEAP1, lo que lleva a la activación de genes nADN (ADN nuclear) de respuesta a estrés y elementos de respuesta antioxidante (Adam J *et al*, 2011).

También se ha propuesto la inhibición de PHDs y la estabilización de HIF1 α independiente de la concentración de oxígeno secundaria a la inactivación de FH como un fenómeno oncogénico (Frezza C *et al*, 2011).

IDH1 e IDH2 se encargan de la descarboxilación de isocitrato a α -cetoglutarato, generando NADPH a partir de NADP. Mutaciones en estos genes se han relacionado con el desarrollo de diferentes neoplasias, con una especial importancia en gliomas de bajo grado, ya que definen un subgrupo molecular de mejor pronóstico. La mutación más frecuente causa la sustitución de arginina 132 en el sitio activo de IDH1, lo que provoca que se utilice NADPH para reducir α -cetoglutarato a (R)-2 hidroxiglutarato (R-2HG), aumentando la producción de esta última molécula (Ward PS *et al*, 2010). R-2HG activa a PHD1 y PHD2 (HIF prolihdroxilasa 1 y 2), lo que reduce los niveles de HIF-1 α , que en esta situación actúa como un gen supresor tumoral (Turcan S *et al*, 2012). También causa cambios epigenéticos extensos, con un aumento de la metilación de las islas CpG que afectan a genes relacionados con crecimiento tumoral y angiogénesis (Koivunen P *et al*, 2012). Por último, afecta al equilibrio redox al utilizar NADPH para la reducción de α -cetoglutarato a (R)-2hidroxiglutarato (R-2HG). De esta forma se inhibe la glutatión peroxidasa y aumentan los niveles H₂O₂.

6. DESDIFERENCIACIÓN CELULAR Y FUNCIÓN MITOCONDRIAL

Se consideran células madre aquellas que son capaces de dividirse y generar diferentes tipos celulares, y una de sus propiedades más importantes es la capacidad de autorrenovación. En condiciones fisiológicas, a medida que se van diferenciando adquieren características y funciones de un tipo específico, y a la vez reducen sus capacidades proliferativas.

En el contexto de enfermedades neoplásicas reciben el nombre de células madre cancerosas (CMC), conforman una pequeña proporción de las células tumorales (0.2-0.8% en adenocarcinoma de páncreas), y tienen una gran importancia en la tumorigénesis y progresión dado su alto potencial

proliferativo y su frecuente resistencia a las terapias habituales (Gonçalves JM *et al*, 2018; Easwaran H *et al*, 2014; Sinha N *et al*, 2013). De hecho, una de las posibles explicaciones de la transitoriedad del efecto de los tratamientos antineoplásicos es la incapacidad de los mismos para destruir a las CMC, por lo que el desarrollo de terapias dirigidas frente a este subgrupo de células sería especialmente efectivo (Reya T *et al*, 2001). La transición epitelio-mesénquima (TEM) es un proceso de desdiferenciación que induce la generación de las CMC. Este proceso está marcado por la inhibición de la adhesión intercelular secundaria a la disminución de la expresión de E-cadherina, y por la potenciación de la motilidad favorecida por la remodelación del citoesqueleto y la formación de adhesiones célula-sustrato dependiente de proteínas como vimentina (Heiler S *et al*, 2016; Thiery JP *et al*, 2009).

Diferentes marcadores se han propuesto para identificar las CMC, pero pueden variar en función del tipo tumoral (Nguyen LV *et al*, 2012). En el caso del adenocarcinoma de páncreas, los más aceptados y mejor establecidos son c-Met, CD133, CD44, CXCR4, EpCAM, Tspan8 y $\alpha\beta4$. La mayor parte de ellos se han relacionado con TEM, y la adquisición de características propias de CMC (Heiler S *et al*, 2016; Hermann PC *et al*, 2007; Li C *et al*, 2007). Se han identificado varias rutas de señalización implicadas con las CMC, incluyendo Sonic hedgehog (SHH), TGF β (*transforming growth factor*)/SMAD, STAT3 (traductor de señales y activador de la transcripción 3), Wnt/ β -catenina, C-Met, entre otras, y fármacos dirigidos frente a ellas han obtenido resultados prometedores en estudios pre-clínicos, aunque todavía no se disponen de datos favorables con pacientes (Pelosi E *et al*, 2017).

En comparación con células tumorales diferenciadas, las CMC de adenocarcinoma de páncreas son relativamente quiescentes y tienen una mayor quimiorresistencia, pero por otro lado tienen una alta dependencia del metabolismo mitocondrial (Sancho P *et al*, 2015; Ning X *et al*, 2016). Terapias dirigidas frente a esta organela se han propuesto como método para erradicar las CMC, ya sea mediante la inhibición de la biogénesis mitocondrial (De Luca A *et al*, 2015), bloqueando los sustratos necesarios para su funcionamiento o incluso mediante la inactivación directa de algunos de sus componentes como la ATP sintasa Lamb R *et al*, 2015). MYC juega un papel especialmente relevante, puesto que si bien en otros tipos tumorales como cáncer de mama o hepatocarcinoma se ha relacionado con *stemness* (Akita H *et al*, 2014; Yang A *et al*, 2017), en el caso del adenocarcinoma de páncreas parece ser un regulador fundamental de la resistencia de las CMCs a

inhibidores de la fosforilación oxidativa, aumentando la plasticidad metabólica de las células (Sancho P *et al*, 2015).

Diferentes familias de antibióticos de uso habitual en la práctica clínica como pueden ser macrólidos, tetraciclinas u oxazolidinonas han demostrado inhibir la función mitocondrial, por lo que se ha planteado su utilización para erradicar las CMC (Lamb R *et al*, 2015). También es el caso de la metformina, cuyo papel se tratará con mayor detalle más adelante.

6.1. Células madre cancerosas y autofagia

La autofagia es un mecanismo de degradación de componentes celulares innecesarios o disfuncionales, con lo que se mantiene la homeostasis. Hay tres categorías, macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas, aunque cuando se habla de este proceso normalmente se hace referencia a la primera.

De forma simplificada, una parte del citoplasma es rodeada por un saco membranoso denominado "fagoforo" o "membrana de aislamiento". A continuación los agregados son envueltos en una doble membrana, formándose el denominado "autofagosoma", que madura y se une a los lisosomas, recibiendo el nombre de autolisosomas, donde se produce la degradación enzimática. Este proceso produce energía a partir de contenido citoplasmático, incluyendo organelas dañadas o redundantes y proteínas, permite la posterior reutilización de los componentes de las estructuras degradadas, previene la acumulación de productos de desecho (Kardideh B *et al*, 2019).

La autofagia tiene un papel muy relevante en el mantenimiento de las funciones de las células madre, y disminuye la generación de especies de oxígeno reactivo (ROS) (Lei Y *et al*, 2017). En el caso de las CMC, la autofagia también es fundamental para su mantenimiento, y capacidad migratoria e invasiva. Un estudio demostró que las CMC de osteosarcoma (CD271+) presentan una mayor dependencia de la autofagia en comparación con células diferenciadas (CD271-) en condiciones de hipoxia y bajos nutrientes. La inhibición de la autofagia mediante ARN interferente provocó una disminución de la expresión de marcadores de células madre en estas células, y una reducción de su tumorigenicidad *in vitro* e *in vivo* en ratón desnudo (Zhang D *et al*, 2016). En el

caso del adenocarcinoma de páncreas, se ha demostrado como la autofagia se encuentra aumentada en CMCs, y es fundamental para la supervivencia de las células en medio con hipoxia y déficit de nutrientes. La inhibición química disminuyó la formación de esferoides y migración *in vitro*, y tumorigenicidad *in vivo* en modelo murino (Rausch V *et al*, 2012). En otro trabajo, la inhibición de la autofagia mediante el inhibidor químico 3-metil adenina (3-MA) o el silenciamiento de HIF-1 α mediante siARN disminuyó significativamente la proporción de células CD133+ (Zhu H *et al*, 2013).

6.2. Susceptibilidad de las células madre cancerosas a metformina

La metformina pertenece a la familia de las biguanidas, y es uno de los fármacos antidiabéticos más utilizados. Disminuye los niveles de glucosa en sangre periférica mediante el aumento de la captación de glucosa en tejidos periféricos, la disminución de la gluconeogénesis, el bloqueo de la acción del glucagón, y la disminución de la absorción de glucosa en el tracto digestivo (Pernicova I *et al*, 2014).

Diferentes estudios epidemiológicos han relacionado la toma de metformina con un menor riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer, entre ellos el de páncreas. En un meta-análisis que incluía 11 estudios con un total de 4042 pacientes se objetivó una reducción del 31% en la incidencia de adenocarcinoma de páncreas y carcinoma hepatocelular (Decensi A *et al*, 2010), mientras que en otro meta-análisis de 37 estudios con 1.535.636 pacientes la reducción del riesgo de desarrollar cáncer de páncreas fue del 46% (Zhang P *et al*, 2013). Además, un estudio retrospectivo de pacientes diabéticos con adenocarcinoma de páncreas vio una mayor SG en aquellos que tomaban metformina (15.2 meses frente a 11.1 meses, $p=0.004$), con un *hazard ratio* (HR) de 0.64 (IC95% 0.48-0.86) por análisis multivariante (Sadeghi N *et al*, 2012).

A nivel molecular, estudios preclínicos han comprobado como la metformina disminuye la proliferación al bloquear el ciclo celular en fase G0/G1 fundamentalmente inhibiendo la fosforilación oxidativa y la función de mTOR mediante vía activación de AMPK, según los mecanismos descritos en el apartado 4.1.2. Además, AMPK también inhibe a *acetyl-Coa carboxylase* (ACC) y a *fatty-acid synthase* (FASN), impidiendo así la adaptación de las células

tumorales mediante la lipogénesis a las altas necesidades metabólicas (Saini N *et al*, 2018). También *in vivo*, en modelos murinos de xenoinplante de adenocarcinoma de páncreas se han visto respuestas tumorales con reducciones del volumen de hasta el 80% con la administración de metformina tanto por vía oral como intraperitoneal (Kisfalvi K *et al*, 2013).

Respecto a las CMC de adenocarcinoma de páncreas, la metformina se ha propuesto como un fármaco que podría ser especialmente efectivo para su eliminación. Diferentes trabajos han demostrado sinergia entre la inhibición de la glicolisis y la administración de metformina, tanto *in vitro* como en modelos xenoinplantes murinos (Ben Sahra I *et al*, 2010; Cheong JH *et al*, 2011), y dado que las CMC de adenocarcinoma de páncreas tienen una alta dependencia del metabolismo mitocondrial a costa de una reducción de la glicolisis, es lógico suponer que puedan ser especialmente sensibles a este fármaco. El estudio de Lonardo E vio una mayor destrucción *in vitro* de CMC en comparación con no-CMC con la administración de metformina, dada la reducción de células con expresión de CD133, CD44 y CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*), y una disminución de la formación de tumores *in vitro* en un ensayo de formación de esferas e *in vivo* en un modelo murino, disminuyendo su capacidad migratoria e invasiva. Además se comprobó cómo estos efectos eran independientes de la vía AMPK/mTOR, sino que se debían a la inhibición de la cadena respiratoria mitocondrial (Lonardo E *et al*, 2013). El trabajo de Sancho P *et al*. detectó *in vitro* una alta sensibilidad de las células de adenocarcinoma de páncreas CD133+ al tratamiento con metformina (Sancho P *et al*, 2015). Otros estudios han confirmado esta acción preferente a nivel de las CMC, con una disminución de la expresión de marcadores como CD44, CD133, ALDH1 y EpCAM medidos por citometría de flujo o qPCR en respuesta a concentraciones crecientes del compuesto (Gou S *et al*, 2013; Mohammed A *et al*, 2013).

En resumen, la vía *PI3K/AKT/mTOR* es de una importancia fundamental en adenocarcinoma de páncreas humano, no obstante las terapias dirigidas frente a ella no han sido efectivas, posiblemente debido al escape a través de rutas de autorregulación negativa. *AKT* es uno de los nodos principales de esta vía, dada la convergencia en ella de múltiples cascadas oncogénicas. Se conocen 3 isoformas de AKT: AKT1/PKB α , AKT2/PKB β y AKT3/PKB γ . Tienen una estructura similar, aunque hay evidencia de que algunas de sus funciones pueden ser específicas y variar en función del tipo tumoral en el que se expresan.

ESTADO DE LA CUESTIÓN

Una de muchas las funciones con las que se relaciona AKT es el metabolismo celular y procesos bioenergéticos. Está descrito como en las células cancerosas se produce un cambio en el metabolismo, potenciándose la glicolisis en detrimento de la producción de energía mitocondrial independientemente de la disponibilidad de oxígeno en el medio, lo que se conoce como el *Efecto Warburg* o la *glicolisis aeróbica*. El posible papel individual de cada isoforma de AKT en este proceso es desconocido hasta la fecha, y su estudio podría ser de gran importancia en el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas, además de mejorar de forma significativa la comprensión que tenemos de las rutas moleculares en esta y otras neoplasias.

Por otro lado, la alta dependencia de las CMCs del metabolismo mitocondrial y la relación de la ruta *PI3K/AKT/mTOR* con el mismo, puede ser una oportunidad para actuar contra este subgrupo celular implicado en la resistencia al tratamiento.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

1. Evaluar *in vitro* los efectos de una inhibición diferencial de cada una de las isoformas de AKT en una línea celular de adenocarcinoma de páncreas metastásico.
2. Caracterizar mediante proteómica cuantitativa diferencial los mecanismos de escape y adaptación de dichas células al silenciamiento individual de las isoformas de AKT.
3. Estudiar tanto *in vitro* como *in vivo* la posible sinergia entre la inhibición de AKT y terapias dirigidas frente a las principales rutas de escape detectadas por los estudios de proteómica cuantitativa.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES

a) Línea celular AsPC-1 / ATCC CRL1682

Esta línea celular se adquirió de la colección americana de cultivos (*American Type Culture Collection* (ATCC)) (Virginia, Estados Unidos). Estas líneas se aislaron en un modelo de ratón desnudo xenotransplantado con las células de adenocarcinoma de páncreas humano en estadio avanzado (metastásico), obtenidas de líquido ascítico de una paciente caucásica de 62 años. Cuenta con las alteraciones genéticas esperables para esta enfermedad en este contexto clínico, en concreto:

- Activación constitutiva de K-RAS (c.35G>A).
- Inactivación de p53 (c.403delT).
- Inactivación de p16/CDKN2A (c.233_234delTC).
- Mutación de MAP2K4 (c.1-?_393+?del; delección desde un nucleótido indeterminado de la región no traducida del primer exón hasta un nucleótido indeterminado del intrón después del nucleótido 393 del ADN codificante).
- Mutación FBXW7 (c.1393C>T).

Las células se cultivaron *in vitro* siguiendo procedimientos estándar, en medio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) de Gibco suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) y 1% de penicilina/estreptomicina, a una temperatura de 37°C y con concentración de CO₂ del 5%.

b) Línea celular HEK 293T / ATCC CRL-3216

Se adquirió de la ATCC (Virginia, Estados Unidos), y proceden de células de riñón fetal humano inmortalizadas por transducción con adenovirus y transfección estable de un plásmido de expresión del antígeno *SV40 large T* (*Simian Vacuolating Virus 40 TAg*). Estas células permiten el mantenimiento de cualquier plásmido transfectado que contenga el origen de replicación SV40. Debido a sus altas capacidades proliferativas y de expresión de proteínas, se utilizan rutinariamente para la producción de vectores virales como los lentivectores. Las células se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) de Gibco suplementado con 10% de FCS y 1% de

MATERIALES Y MÉTODOS

penicilina/estreptomicina, a una temperatura de 37°C y con concentración de CO₂ del 5%.

c) Medio de congelación

Para la congelación y mantenimiento de las células originales y modificadas, se utilizó una solución del 10% de dimetilsulfóxido (*DMSO Hybri-MaxTM* >99.7%, *Sigma Aldrich*) en FCS, siguiendo procedimientos rutinarios en biología celular.

2. DISEÑO DE ARNs INTERFERENTES Y CLONAJE DE ADN PLASMÍDICO

Los ARNs interferentes de tipo *short hairpin* (shARN) son moléculas pequeñas de ARN que silencian de forma estable y específica un gen determinado mediante la degradación de su ARN mensajero (mARN). Su estructura consiste en una doble cadena de entre 19-22 pares de bases con una horquilla de 4-11 nucleótidos no apareados. El diseño específico de las secuencias de shARN utilizadas para silenciar los genes de interés se realizó utilizando la herramienta bioinformática de Clontech (<http://bioinfo.clontech.com/rnaidesigner/>). La síntesis de los oligonucleótidos que conforman las moléculas de shARN se encargaron a la plataforma Eurofins Genomics (Tabla 1).

shControl (shCT)	5' - GCAACAAGATGAAGAGCACCAA - 3'
shAKT1:	5' - CGCGTGACCATGAACGAGTTTCTCGAGAACTCGTTCATGGTCACGCGTTTTTG - 3'
shAKT2:	5' - CGGCTCCTTCATTGGGTACAACCTCGAGTTGTACCCAATGAAGGAGCCGTTTTTG - 3'
shAKT3:	5' - GTAGTCCAACCTCACAAATTGCTCGAGCAATTTGTGAAGTTGGACTACTTTTTTG - 3'
shHARS2:	5' - ATTAACCCAGCTGCACTATTGTTCAAGAGACAATAGTGCAGCTGGGTTAATTTTTTTG - 3'
shSSBP1:	5' - GCATGGCACAGAATATCAGTATTTCAAGAGAATACTGATATTCTGTGCCATGTTTTTTG - 3'
shTFB2M	5' - GCCCAAAGCGTAGGGAATTATTTTCAAGAGAAATAATTCCTACGCTTTGGGTTTTTT G - 3'

Tabla 1: Secuencias de los principales shARN utilizados en el proyecto.

Las secuencias codificantes de shARNs se clonaron en el lentivector de expresión pHIV-SIREN (Gato-Cañas M *et al*, 2017), que asocia la co-expresión del ARN interferente bajo el control del promotor U6 y un gen de resistencia antibiótica bajo el promotor de la proteína quinasa de phosphoglycerolato (PGK), como la resistencia a puromicina (PuroR) o a blasticidina (BlastR).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las secuencias de shARN se clonaron en los plásmidos pHIV-SIREN PuroR o pHIV-SIREN BlastR mediante técnicas estándar en biología celular, bajo las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. Para los clonajes, la extracción de ADN de gel se realizó mediante el kit de extracción de ADN de agarosa (*agarose DNA extraction*) de Qiagen, y la purificación de los vectores plasmídicos finales con la pureza suficiente para transfección y producción de lentivectores, se realizó con el kit Midiprep de Qiagen.

Las purificaciones de plásmido se realizaron a partir de cultivos de bacterias competentes transformadas con los plásmidos de interés mediante el procedimiento de choque térmico (Froger A *et al*, 2007). Las bacterias competentes se generaron siguiendo un protocolo estándar basado en lavados con cloruro de calcio y litio (Chan WT *et al*, 2013).

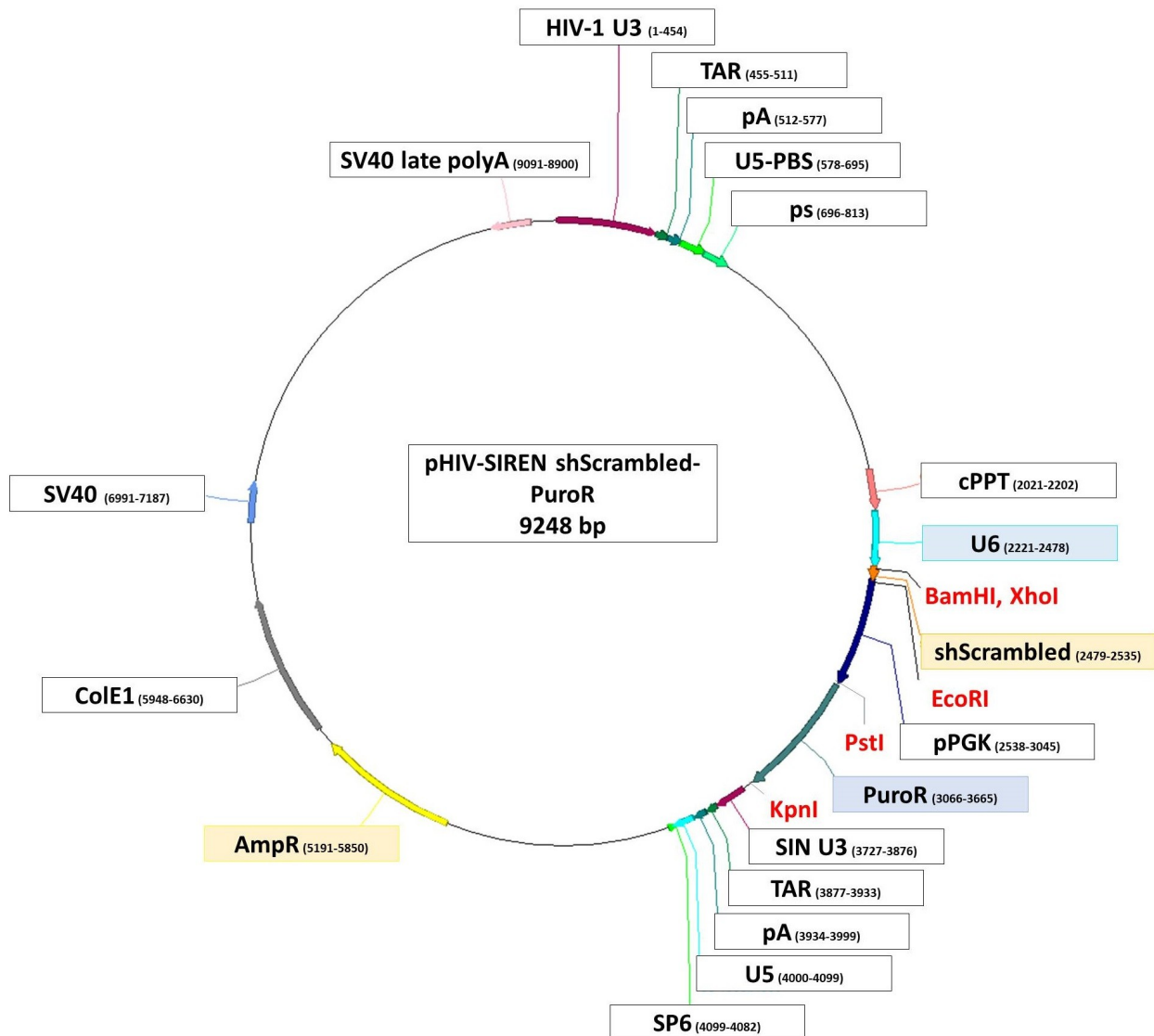


Figura 7. Representación esquemática generada con ApE del vector pHIV SIREN junto con los sitios de restricción utilizados con más frecuencia.

3. GENERACIÓN DE LENTIVECTORES

Los vectores lentivirales o lentivectores son una de las herramientas utilizadas con mayor frecuencia en terapia génica, dado que pueden integrar secuencias de ADN de forma estable en el genoma de la célula diana. Consisten en partículas pseudo-virales que encapsidan un genoma de ARN recombinante empaquetado por las proteínas estructurales de VIH-1 (habitualmente). Los lentivectores están envueltos por una membrana lipídica que contiene, en nuestro caso, la proteína de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular humana (VSV-G). La producción y generación de lentivectores se ha explicado con detalle en otros trabajos, y no es el foco principal de la tesis doctoral (Liechtenstein T *et al*, 2013). En esta tesis, se han utilizado vectores lentivirales de segunda generación auto-inactivadores (Escors D *et al*, 2010; Liechtenstein T *et al*, 2013). Los insertos incorporados en estos vectores se clasifican como material biológico de nivel I de bioseguridad, aunque el trabajo se ha desarrollado bajo condiciones de bioseguridad II debido al método de producción a partir de las células HEK 293T.

Brevemente, las preparaciones de lentivectores se generan transfectando células HEK 293T con el plásmido de empaquetamiento p8.91/gag-pol, el plásmido de envoltura pMDG/VSV-G y el propio plásmido de transferencia, que codifica para el “minigenoma” ARN que contiene las secuencias de interés (Liechtenstein T *et al*, 2013). Las transfecciones se realizaron con el reactivo de transfección FuGENE® HD siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Las partículas de lentivectores liberadas al medio extracelular se recogieron durante 4 días consecutivos, filtrándose y obteniendo así las preparaciones de lentivectores listas para su utilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

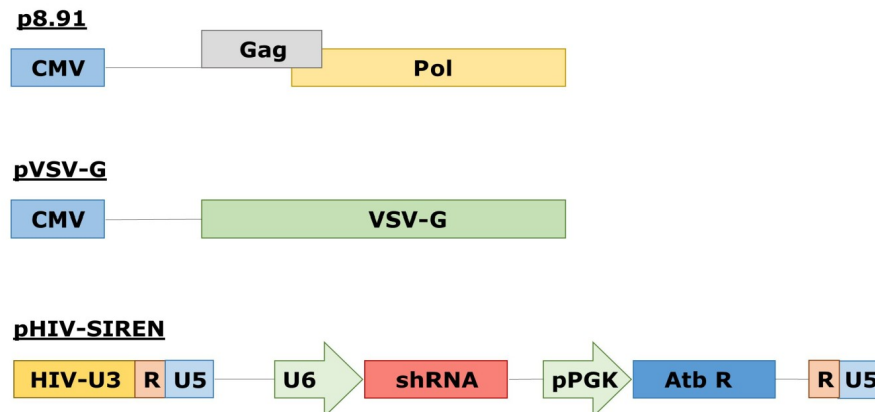


Figura 8. Esquema de los plásmidos de empaquetamiento, envoltura y transferencia utilizados para la síntesis de lentivectores.

4. TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS CON LENTIVECTORES Y SELECCIÓN CON ANTIBIÓTICOS

Para modificar genéticamente células AsPC-1 con los lentivectores de interés (transducción), las células se distribuyeron en un total de medio millón por pocillo, en placas de cultivo celular de 6 pocillos (Nunc). A continuación se añadió el volumen de preparación de lentivector correspondiente a una multiplicidad de transducción aproximada de 10 partículas de lentivector por célula. Para seleccionar las células modificadas, se añadió a las 24 horas puromicina o blasticidina a las concentraciones tóxicas para esta línea celular. Nos aseguramos de que la selección de las células modificadas fue correcta monitorizando la muerte celular en un cultivo control sin modificar. Las concentraciones de antibióticos capaces de inducir la muerte del 100% de las células de adenocarcinoma de páncreas se calcularon mediante antibiogramas con concentraciones ascendentes de cada compuesto. En el caso de blasticidina, una concentración final de 15 $\mu\text{g/ml}$, con una incubación de 5-6 días para alcanzar la muerte del 100% de células sin modificar. En el caso de puromicina, una concentración final de 7 $\mu\text{g/ml}$, siendo necesarias incubaciones de 48-72 horas para conseguir la muerte del 100% de células sin modificar. Las células modificadas genéticamente con lentivectores se amplificaron en cultivos de frascos de 75 cm^2 . Durante este proceso se añadieron los antibióticos de selección al medio durante semanas alternantes, para así

MATERIALES Y MÉTODOS

asegurar el mantenimiento de la expresión de las construcciones y minimizar los costes. Las células se mantuvieron por pases seriados con tripsina, siguiendo protocolos rutinarios en biología celular.

5. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS EN MEMBRANAS DE NITROCELULOSA CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS (*Western Blot*)

Tanto para confirmar los silenciamientos específicos de las isoformas de AKT como para validar los resultados de los estudios de proteómica se realizaron varios *Western Blot* utilizando técnicas rutinarias en biología molecular y bioquímica.

Para los análisis, las proteínas celulares se extrajeron a partir de 10^6 células, cuantificadas por conteo en hemocitómetros. Tras dos lavados con PBS (buffer fosfato salino), las células se lisaron en PBS con 1% de NP-40 (Nonidet P-40, un detergente no-iónico no-desnaturalizante) e inhibidores de proteasas (*Pierce Protease Inhibitor*, *ThermoFisher Scientific*). Se eliminaron los núcleos por centrifugación de 1 min en un microcentrífuga de mesa, y la fracción citoplasmática se trató con solución Laemmli desnaturalizante (con β -mercaptoetanol) a 90°C durante 5 minutos. Las preparaciones de proteínas se guardaron congeladas a -80°C hasta su uso.

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 12%, y la transferencia de proteínas a nitrocelulosa se realizó utilizando técnicas rutinarias. Los tamaños de las proteínas se estimaron utilizando un carril con marcadores proteicos con peso molecular conocido (*PageRuler Prestained*, *ThermoFisher Scientific*). La membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas se bloqueó con una solución al 5% de leche en polvo desnatada en PBS durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. La detección de proteínas se realizó por incubación en solución de bloqueo con los anticuerpos primarios específicos (tabla 2) para cada una de las proteínas de interés, a las concentraciones y en las condiciones recomendadas por las casas comerciales. La detección se realizó con anticuerpos secundarios correspondientes a los isotipos y especies de los anticuerpos primarios, conjugados con peroxidasa. Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia utilizando técnicas rutinarias en biología molecular, en un transiluminador Bio-Rad ChemiDoc™ MP Imaging System.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANTICUERPOS PRIMARIOS		
ANTICUERPO	ESPECIE	EMPRESA
Anti-AKT1 (2H10)	Ratón	Cell Signaling
Anti-AKT2 (L79B2)	Ratón	Cell Signaling
Anti-AKT3 (L47B1)	Ratón	Cell Signaling
Anti-ATP5A	Ratón	Abcam
Anti-eIF4B	Conejo	Cell Signaling
Anti-p-eIF4B (S422)	Conejo	Cell Signaling
Anti-HADHA	Conejo	Abcam
Anti-LC3B	Conejo	Sigma Aldrich
Anti-mTOR	Conejo	Cell Signaling
Anti-c-MYC	Ratón	Invitrogen
Anti-PDCD6	Conejo	Abcam
Anti-TFB2M (C-term)	Conejo	OriGene
Anti-VDAC1	Ratón	Abcam
ANTICUERPOS SECUNDARIOS		
ANTICUERPO	EMPRESA	
Rabbit Anti-Mouse Polyclonal Immunoglobulins/HRP	Dako	
Swine Anti-Rabbit Polyclonal Immunoglobulins/HRP	Dako	

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección de proteínas.

6. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo se realizó en un citómetro FACS CANTO Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BDIS). Los datos de citometría se recogieron con el programa DIVA y se analizaron con el programa Flowjo. La detección de los marcadores de superficie e intracelulares por citometría de flujo se llevaron a cabo utilizando protocolos rutinarios en biología celular (Maciorowski Z *et al*, 2017).

7. ESTUDIOS DE DINÁMICA CELULAR

7.1 Proliferación celular

La cuantificación de la proliferación celular se estimó por citometría de flujo cuantificando el porcentaje de expresión de Ki-67, un marcador surrogado de proliferación celular generalmente aceptado (Gerdes J *et al*, 1984). La cuantificación se llevó al cabo en al menos 3 cultivos celulares independientes por cada línea celular, a partir de 3×10^5 células por pocillo en placas de cultivo de 6 pocillos. Después de 24 horas tras un pase celular, y si transcurrido este tiempo el número y el estado de las células era apropiado, las células se despegaron y se realizó la tinción intracelular para la detección de proliferación con el anticuerpo Ki67-APC de Biolegend siguiendo protocolos de rutina (Karwacz K *et al*, 2011).

7.2 Apoptosis

La evaluación y cuantificación de la muerte celular por apoptosis se llevó a cabo mediante el método clásico por citometría de flujo de doble tinción de anexina V y yoduro de propidio utilizando el kit Invitrogen™ eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit. Se cuantificaron las células apoptóticas en la población celular que mostraba integridad de membranas (yoduro de propidio negativas) y positividad de unión a anexina V.

7.3 Crecimiento celular

Los estudios de crecimiento celular a tiempo real se realizaron con el equipo RTCA iCELLigence™ de ACEA Biosciences utilizando protocolos aconsejados por la casa comercial (Türker Şener L *et al*, 2017). Este dispositivo cuantifica proliferación, adhesión y cambios en la morfología celular mediante el incremento/disminución de la impedancia (resistencia) al paso de una corriente eléctrica circulando por un circuito conductor en el fondo de las placas de cultivos celulares. Esta información se recoge y transmite en tiempo real a un receptor para el análisis de los datos. Los

MATERIALES Y MÉTODOS

cambios de impedancia se transforman en una variable relativa denominada índice celular (*cell index*, CI), que se representa de forma gráfica en función del tiempo. Un número específico de células (usualmente 20.000) se crecieron en 500 µl de medio de cultivo completo por pocillo de tipo E8 (ACEA). Se monitorizó el crecimiento celular hasta la confluencia. Se realizaron al menos 4 repeticiones por cada línea celular, y los experimentos se repitieron de manera independiente para confirmar los hallazgos. En aquellos experimentos de citotoxicidad en los que las células se expusieron a diferentes compuestos para evaluar sus efectos, los compuestos se añadieron cuando éstas han iniciado un crecimiento estable y constante.

7.4 Desdiferenciación celular

La desdiferenciación celular de la línea AsPC-1 se evaluó mediante la detección de la co-expresión en superficie de CD44 y EpCAM por citometría de flujo con anticuerpos específicos conjugados con APC y APC-Vio770 respectivamente (CD44-APC monoclonal, reactividad humana y CD326/EpCAM-Apc-Vio770 monoclonal, reactividad humana, ambos de Miltenyi Biotec). Estos dos marcadores están bien establecidos como marcadores de células madre cancerosas. La preparación de las células para los experimentos se llevó a cabo de forma análoga a lo descrito en los estudios de apoptosis y proliferación detallados anteriormente.

7.5 Evaluación de autofagia

La autofagia se midió de acuerdo a los niveles de expresión de la proteína LC3B (*microtubule-associated protein light chain 3*), que cambia de una forma citosólica (LC3B-I) a otra unida a la membrana del autofagosoma (LC3B-II) durante el proceso de autofagia. Para ello las células fueron sometidas durante 24 horas a cloroquina, que impide la fusión entre el autofagosoma y el lisosoma, y por lo tanto la degradación de los autofagosomas (Mauthe M *et al*, 2018). Se utilizaron concentraciones crecientes de cloroquina, 50 y 100 µM. De esta forma, la autofagia se correlacionó con la concentración de LC3B-II medida por *Western Blot*, que se realizó de forma estándar tal y como se ha descrito anteriormente. Estos experimentos se llevaron a cabo con la colaboración del Dr. Carlos Hernández, que cuenta con amplia experiencia en este campo.

8. PROTEÓMICA CUANTITATIVA DIFERENCIAL

Para comparar cuantitativamente los proteomas procedentes de las líneas celulares AsPC-1 shCT, AsPC-1 -shAKT1, AsPC-1 -shAKT2 AsPC-1 -shAKT3 se realizaron estudios de espectrometría de masas cuantitativa diferencial basada llevados a cabo por el grupo de Proteómica de Navarrabiomed, siguiendo las indicaciones adecuadas y partiendo de muestras celulares con tres replicados por cada línea.

8.1 Preparación de las muestras

Las muestras de células sedimentadas por centrifugación se resuspendieron en solución de lisis compuesta por urea 7M, tiourea 2M, detergente CHAPS al 1% y ditrioteitol (DTT) 50mM. Los homogeneizados se centrifugaron a 14.000 rpm durante 1 hora a 15°C. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se midió mediante el procedimiento de Bradford (Bio-rad).

8.2 Análisis proteómico mediante iTRAQ

Se llevó a cabo un análisis proteómico comparativo utilizando iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantitation*). Se utilizaron 3 réplicas biológicas en cada condición experimental. Los extractos de proteína se precipitaron con metanol/cloroformo, y los precipitados se disolvieron en urea 7M, tiourea 2M y CHAPS (v/v) 4%. Las proteínas se cuantificaron por el método Bradford. El etiquetado iTRAQ de cada muestra se realizó de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (ABSciex) a partir de un total de 80 µg de proteína de cada muestra reducida durante 1 hora a 60°C con tris (2-carboxietil) fosfine (TCEP) 50 mM. Los residuos cisteína se alquilaron a temperatura ambiente durante 15 minutos con 200 mM de metilmetanometiosulfonato (MMTS). La digestión enzimática de las proteínas se realizó con tripsina (Promega; 1:20 w/w) a 37°C durante 16 horas. Cada digestión se etiquetó con una marca isobárica amino-reactiva, siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de incubar durante 1 hora, cada grupo de muestras etiquetadas

MATERIALES Y MÉTODOS

se agruparon de forma independiente y se evaporaron en una centrifuga de vacío hasta un volumen inferior a 40 μ l.

Los péptidos marcados se inyectaron en un sistema Ettan LC con una pre-columna X-Terra RP18 (2.1 x 20 mm) y una columna X-Terra RP18 estable a pH alto (C18; 2.1 x 150 mm, 3.5 μ m) (Waters) a un flujo de 40 μ l/min. Los péptidos se eluyeron durante 35 minutos con una fase móvil B de gradiente lineal 5-65% (A, bicarbonato de amonio 5 mM en agua a pH 9.8; B, bicarbonato de amonio 5 mM en acetonitrilo a pH 9.8). Se recogieron las fracciones, se evaporaron en vacío y se reconstituyeron en 20 μ l de acetonitrilo 2%, ácido fórmico 0.1% y H₂O miliQ 98%.

8.3 Espectrometría de masas triple-TOF 5600

Las mezclas de péptidos se separaron mediante cromatografía de fase inversa utilizando una bomba Eksigent nanoLC ultra 2D ajustada con una columna ID 75 μ m (Eksigent 0.075 x 150). Las muestras se desalinizaron y concentraron en una pre-columna ID 300 μ m de 0.5 cm de longitud empaquetada con la misma composición que la columna de separación. Las fases móviles estaban compuestas por 100% agua + 0.1% ácido fórmico (buffer A) y 100% acetonitrilo + 0.1% ácido fórmico (buffer B). El gradiente de columna se desarrolló en un gradiente de 2 pasos durante 70 minutos: de 2% a 30% buffer B en 60 minutos y de 30% a 40% buffer B en 10 minutos. La columna se equilibró con un 95% buffer B durante 5 minutos y 2% buffer B durante 15 minutos. Durante todo este proceso el flujo se mantuvo a 300 nl/min. Los péptidos eluidos se analizaron en un espectrómetro de masas AB Sciex 5600 Triple TOFTM. La adquisición de información se llevó a cabo en un rango de masas de 250 m/z a 1250 m/z con un tiempo de adquisición de 250 ms. Los 25 picos más elevados se fragmentaron. El tiempo mínimo de acumulación para MS/MS se estableció en 75 ms, dando un tiempo total de ciclo de 2.1 s. Los productos iónicos fueron se analizaron en un rango de masas de 100 m/z a 1700 m/z y excluidos para fragmentación subsiguiente durante 15 segundos. Después del análisis MS/MS los archivos con los datos obtenidos se analizaron con el programa ProteinPilotTM 4.5 de AB Sciex, que utiliza el algoritmo ParagonTM (v.4.0.0.0) para búsqueda en bases de datos y ProgroupTM para la agrupación de datos, y rastreados en la base de datos humana de Uniprot. La tasa de falsos positivos (*False Discovery Rate*, FDR) se estimó utilizando un método de encaje no lineal, y los resultados analizados fueron aquellos con un FDR superior al 1%.

MATERIALES Y MÉTODOS

La cuantificación relativa e identificación de proteínas se llevó a cabo con el software ProteinPilot™ (versión 4.5; ABSciex) utilizando el algoritmo Paragon™ como motor de búsqueda. Cada espectro MS/MS se rastreó en una base de datos de secuencias de proteínas humanas (Uniprot). Sólo se consideraron para cuantificación relativa aquellos péptidos únicos para una determinada proteína.

9. GENERACIÓN DE INTERACTOMAS FUNCIONALES

Los interactomas funcionales de las proteínas sobre-expresadas e infra-expresadas en cada línea celular en comparación con la línea control se generaron utilizando las interacciones descritas en la base de datos STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) e INGENUITY (Qiagen). Asimismo, se utilizaron las bases de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), GeneCards (<https://www.genecards.org/>) y Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), para evaluar individualmente la función de cada una de las proteínas, y las relaciones con sus nodos.

10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA (IC50)

La concentración inhibitoria media (IC₅₀) es una medida de la eficacia de un determinado compuesto, e indica la cantidad del mismo que es precisa para inhibir una determinada función biológica o bioquímica en un 50%. La sensibilidad de las diferentes líneas celulares a los fármacos indicados en la memoria (tabla 3) se cuantificó estudiando la concentración necesaria para producir la muerte del 50% de las células. La IC₅₀ se calculó utilizando los datos obtenidos por RTCA iCELLigence™ de ACEA Biosciences. Para ello, se depositaron 10⁴ células en pocillos de placas de cultivo E8 de RTCA, y se monitorizó su crecimiento a tiempo real hasta que la proliferación celular estable fuera evidente, normalmente alrededor de las 48-72 horas. En ese momento se añadió a cada pocillo concentraciones crecientes del fármaco de interés. Una vez completado el experimento los valores de índice celular se normalizaron respecto al momento de la aplicación de los fármacos, calculándose la IC₅₀ para cada línea y tratamiento de interés utilizando los modelos matemáticos del programa RTCA.

MATERIALES Y MÉTODOS

5-fluorouracilo	Metformina	Tigeciclina
0.5 μ M	1 mM	0.5 μ M
1 μ M	5 mM	1 μ M
5 μ M	10 mM	2.5 μ M
10 μ M	20 mM	5 μ M
50 μ M		10 μ M
100 μ M		25 μ M
200 μ M		50 μ M

Tabla 3. Fármacos y concentraciones utilizadas en las líneas celulares.

11. TINCIONES MITOCONDRIALES

Las mitocondrias se visualizaron utilizando *MitoTracker Green* (MTG), un compuesto fluorescente con alta afinidad por las mitocondrias de las células vivas independientemente de su potencial de membrana. La tinción con MTG correlaciona con la masa mitocondrial y la actividad oxidativa, tal y como han demostrado otros estudios (Puleston D *et al*, 2015). La pérdida de fluorescencia se ha asociado con mitofagia (Agnello M *et al*, 2008; Gonçalves JM *et al*, 2018). La fluorescencia media emitida por MTG se utilizó para evaluar la masa y función relativas mitocondriales en las líneas celulares de interés, cuantificándose por microscopía óptica utilizando el equipo Cytation 5. Para la tinción con MTG, se depositaron 10^4 células en una placa de cultivos P96 opaca el día anterior a la tinción. Al día siguiente, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco al que se añadió MTG a una concentración de 10 nM durante 15-30 min a 37°C. A continuación, se cambió el medio de cultivo y se examinaron las células por microscopía de fluorescencia adquiriendo las imágenes con los filtros adecuados. Se obtuvieron imágenes representativas de cada cultivo celular, estimándose la intensidad mediana de fluorescencia integrada para su posterior análisis estadístico mediante ANOVA y tests estadísticos pareados *a posteriori*.

12. MEDICIÓN DE FUNCIÓN MITOCONDRIAL

La función mitocondrial de las diferentes líneas celulares se evaluó utilizando el dispositivo Agilent Seahorse XF, en colaboración con la Dra. Eva Santamaría Monasterio, del Programa de Hepatología del Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) de la Universidad de Navarra. Los estudios se centraron fundamentalmente en dos aspectos, respiración mitocondrial y glicolisis, con duplicados y dos experimentos independientes.

Para evaluar la respiración mitocondrial se utilizó el kit Agilent Seahorse XF Cell Mito Stress, que mide directamente la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*) de las células, utilizando además la adición secuencial de diferentes compuestos para poder estimar parámetros como respiración basal, respiración máxima, producción de ATP, flujo de protones y capacidad de reserva. Los fármacos utilizados fueron: oligomicina, inhibidor del complejo V o ATP sintasa, para cuantificar la respiración asociada a la síntesis de ATP; Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP), que colapsa el gradiente de protones y altera el potencial de membrana para cuantificar la respiración máxima; Antimicina A y rotenona, inhibidores del complejo III y el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial respectivamente, para bloquear completamente la respiración mitocondrial y estimar la respiración no mitocondrial. Además, al restar a la OCR tras la adición de oligomicina la OCR no mitocondrial, se calculó la respiración correspondiente al flujo de protones, es decir la respiración no asociada a la producción de ATP.

La glicolisis se estimó por medición de la tasa de acidificación extracelular (ECAR) utilizando el kit Agilent Seahorse XF Glycolysis Test. Dado que en el proceso de la glicolisis se liberan protones al medio extracelular, causando la acidificación del mismo, este experimento permite determinar parámetros como glicolisis, capacidad glicolítica, reserva glicolítica así como acidificación no glicolítica. Primero se calculó la ECAR basal, para después añadir glucosa al medio y poder conocer así la capacidad de glicolisis en condiciones normales. A continuación se añadió oligomicina, que al inhibir la ATP sintasa mitocondrial desvía la síntesis de energía a la vía de la glicolisis, y proporcionará el valor de la capacidad glicolítica máxima. Finalmente con 2-deoxiglucosa, un análogo de la glucosa que se une de forma competitiva a la hexokinasa, se bloqueó la glicolisis para confirmar que la acidificación detectada es generada por esta ruta.

13. MODELOS DE CÁNCER PANCREÁTICO MURINO

Para los modelos de experimentación animal en ratón contamos con el permiso del Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Navarra, y con la autorización del Gobierno de Navarra.

Se realizaron dos experimentos en ratones C57BL/6, utilizando la línea de adenocarcinoma ductal de páncreas murino Panc02, desarrollada por Corbett TH *et al* (Corbett TH *et al*, 1984). Esta línea de ratón muestra un comportamiento comparable al adenocarcinoma de páncreas humano (Partecke LI *et al*, 2011), y presenta algunas de las mutaciones habituales incluyendo un poliformismo de nucleótido único de TAT a TAC en el codón 32 del gen K-RAS, y una mutación homocigótica G a T en la primera posición del codón 174 (GAA) del gen SAMD4, que produce una proteína trunca. Por otro lado, no se detectaron alteraciones en TP53, CDKN2A o PDX-1 (Arya M *et al*, 2005). Las células Panc02 se cultivaron siguiendo protocolos rutinarios en medio RPMI completo.

La línea Panc02 también se adaptó a la inhibición farmacológica de AKT mediante crecimiento constante en presencia de concentraciones progresivamente crecientes del inhibidor X de AKT (Akt Inhibitor X (CAS 925681-41-0, Sigma-Aldrich), un inhibidor selectivo de la fosforilación de AKT. Para el mantenimiento de la línea adaptada, se utilizó una concentración de 50 μ M de inhibidor de AKT, letal para las células Panc02 sin adaptar. Las células adaptadas se mantuvieron un mínimo de 30 días bajo la inhibición de AKT, procediéndose a su mantenimiento en condiciones estándar durante un número limitado de pases.

13.1 Sinergia entre inhibición farmacológica de AKT y metformina como terapia *in vivo*

Se administraron a grupos de 6 ratones C57BL/6 dosis subóptimas de inhibidor X de AKT (1 mg/animal), metformina (1 mg/animal) y su combinación (0.5 mg de inhibidor de AKT + 0.5 mg de metformina) dos veces por semana subcutáneamente. Como control se utilizaron ratones tratados con PBS. El tamaño de los tumores se monitorizó dos veces por semana con un pie de rey, coincidiendo con la administración de los tratamientos. Se establecieron varios puntos finales para cada ratón. El primero, cuando el resultado de multiplicar la longitud por la anchura en superficie de los tumores superó los 140-150 mm². El segundo, si los ratones mostraban signos evidentes de

MATERIALES Y MÉTODOS

sufrimiento. El tercero, si el crecimiento tumoral impedía la locomoción. Por cada grupo se registró el día de sacrificio/muerte de cada ratón y el tamaño tumoral a lo largo del tiempo.

13.2. Eficacia del tratamiento con metformina en cáncer de páncreas adaptado a la inhibición farmacológica de AKT *in vivo*

Dos grupos de 6 ratones C57BL/6 fueron inoculados con células Panc02 comunes; a unos de ellos se les administró metformina a dosis subóptima (1 mg/animal) dos veces por semana, y a los otros, utilizados como control, se les administró PBS. Otros dos grupos de 6 ratones C57BL/6 fueron inoculados con células Panc02 adaptadas a la inhibición farmacológica de AKT; a unos de ellos se les administró metformina a dosis subóptima (1 mg/animal) dos veces por semana y a los otros PBS. La medición de los tumores y los momentos de sacrificio de cada ratón fueron análogos a los del experimento anterior.

14. ESTADÍSTICA

Los cálculos estadísticos se realizaron con los programas SPSS Statistics 25 de IBM y GraphPad Prism 5. La correlación entre variables cuantitativas se evaluó con el test t para muestras independientes (dos grupos) o ANOVA (más de dos grupos) si la distribución era normal, y con U de Mann-Whitney (dos grupos) o Kruskal-Wallis (más de dos grupos) cuando la distribución no era normal o si los datos tenían una alta variabilidad intrínseca. La supervivencia de las distintas cohortes de ratones se compararon mediante el test de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. SILENCIAMIENTO DE LAS ISOFORMAS DE AKT EN LA LÍNEA CELULAR DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS METASTÁSICO HUMANO CRL1682/ASPC-1

En general, la aparición de resistencias a la quimioterapia y a las terapias dirigidas para el tratamiento de los cánceres se ha asociado frecuentemente con la selección de variantes celulares cancerosas que poseen mutaciones que confieren resistencias a los tratamientos. Este mecanismo se sustenta en una selección a partir de una población intrínsecamente heterogénea de células cancerosas presente en el tumor primario. Sin embargo, la selección de células resistentes a las terapias puede tener lugar a partir de mecanismos no genéticos, que incluyen la influencia que ejercen distintos microambientes tumorales que favorecen la supervivencia celular y dediferenciación, las diferencias estocásticas en el contenido mitocondrial de las células cancerosas, y la adaptación metabólica de las células, que inducen una alteración de las rutas bioenergéticas.

Como se ha mencionado en la introducción, la vía de señalización de la PI3K/AKT/mTOR constituye un mecanismo central asociado con la progresión en adenocarcinoma pancreático. Sin embargo, los resultados de estudios clínicos con inhibidores de AKT no han demostrado beneficio en supervivencia global en comparación con los tratamientos de quimioterapia estándar. Para estudiar cómo las células de cáncer pancreático se adaptan a una inhibición sostenida de esta ruta, se diseñaron ARN silenciadores específicos frente a cada una de las isoformas de AKT (tabla 1). De esta manera, se planteó también estudiar la contribución relativa de AKT1, AKT2 y AKT3 a la adaptación metabólica y progresión tumoral. Se utilizó como control una secuencia de ARN interferente irrelevante validada como control negativo en múltiples sistemas celulares obtenida de Sigma Aldrich (tabla 1).

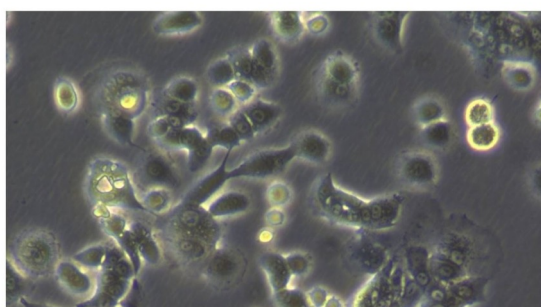
Las secuencias codificantes de ARN interferentes (*short hairpins*) se diseñaron utilizando como dianas secuencias codificantes de cada isoforma de AKT1 validadas por SIGMA en experimentos de interferencia de ARN, y se clonaron en vectores de expresión lentivirales generados por el laboratorio denominados pHIV1-SIREN (Karwacz K *et al*, 2011; Liechtenstein T *et al*, 2014). De esta manera, los insertos se introdujeron bajo el control del promotor de U6 bajo los sitios de restricción BamHI y EcoRI (Figura 7). Las construcciones finales se secuenciaron, y los lentivectores codificantes de los ARNs se generaron por transfección en HEK 293T junto con

RESULTADOS

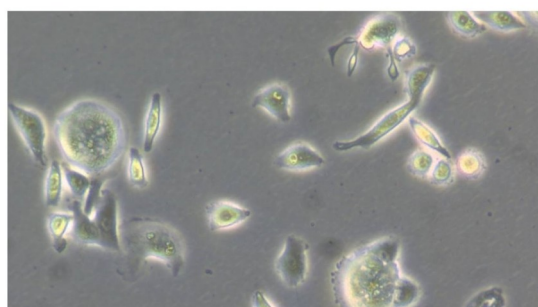
plásmidos de expresión de las proteínas estructurales de HIV1, siguiendo técnicas rutinarias en nuestro grupo.

Se decidió utilizar como base de la tesis doctoral las células AsPC-1, dado que contienen las mutaciones esperadas para el adenocarcinoma de páncreas humano. Estas células se modificaron genéticamente por transducción con cada uno de los lentivectores de manera individual y se seleccionaron con puromicina a concentraciones letales para esta línea celular.

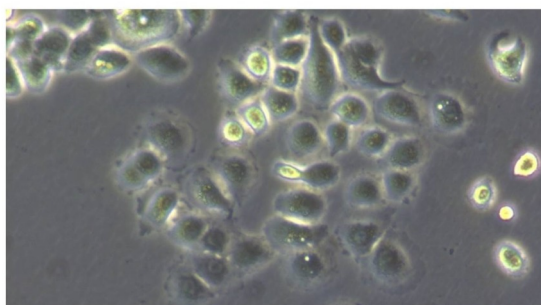
El silenciamiento de las isoformas de AKT indujo en las células un estado prolongado de quiescencia, tras el cual fueron necesarios alrededor de 2 meses para crecerlas en cantidades suficientes para los análisis posteriores. Es importante destacar que la línea celular que expresaba shAKT1 presentó una mayor velocidad de crecimiento que las células con AKT2 o AKT3 silenciado. Las células adaptadas al crecimiento bajo el silenciamiento de cada una de las isoformas de AKT mostraron un cambio fenotípico evidente en comparación con la línea control (Figura 9). Las células adaptadas al silenciamiento de AKT1 presentaron una morfología fusiforme con ramificaciones y disposición aislada, mientras que en el caso de shAKT2 y shAKT3 formaron estructuras más propias de células diferenciadas formando “pseudoacinos glandulares”.



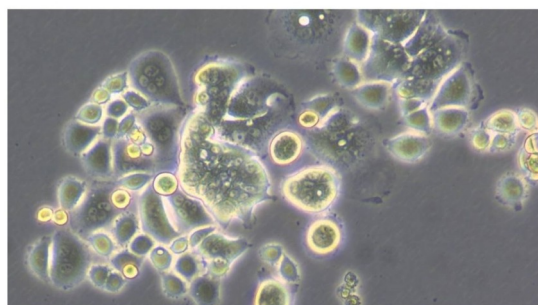
CRL1682 pSIREN shScrambled



CRL1682 pSIREN shAKT1



CRL1682 pSIREN shAKT2



CRL1682 pSIREN shAKT3

Figura 9. Imágenes de microscopía óptica de las líneas celulares una vez que han adquirido resistencia al silenciamiento de cada una de las isoformas de AKT.

RESULTADOS

Para descartar que el mecanismo de adaptación al silenciamiento constitutivo de cada una de las isoformas de AKT fuese debido a la re-expresión de las mismas, que hubiera podido haber ocurrido con el tiempo por metilación de los promotores de los lentivectores integrados, estudiamos el silenciamiento de las isoformas a distintos pases. Se confirmó la inhibición de expresión de las proteínas más allá de 25 pases desde la transducción original por *Western Blot* (figura 10). Dado que habíamos comprobado por proteómica cuantitativa diferencial que las proteínas que se utilizan normalmente como control de carga para el *Western Blot* (GADPH, actinas o miosinas) habían cambiado los niveles con respecto a la línea control expresando el shARN irrelevante, aseguramos la comparabilidad de las muestras mediante conteo celular, lisando 10^6 células por muestra.

Se confirmó que las células que expresaban ARN silenciadores frente a AKT1 y AKT2 inducían un fuerte silenciamiento de la expresión de las mismas. Para estudiar el silenciamiento de AKT3, se utilizó citometría de flujo debido a que el anticuerpo no detectaba la proteína en *Western Blot*. También en este caso se observó un silenciamiento específico de AKT3 en las células adaptadas a la expresión de su correspondiente ARN interferente.

Concluyendo, las células AsPC-1 se adaptaron a la inhibición mantenida de cada isoforma de AKT y, tras un tiempo de quiescencia, recuperaron sus capacidades proliferativas. Es relevante destacar el aparente comportamiento diferencial de la línea en la que se ha silenciado AKT1.

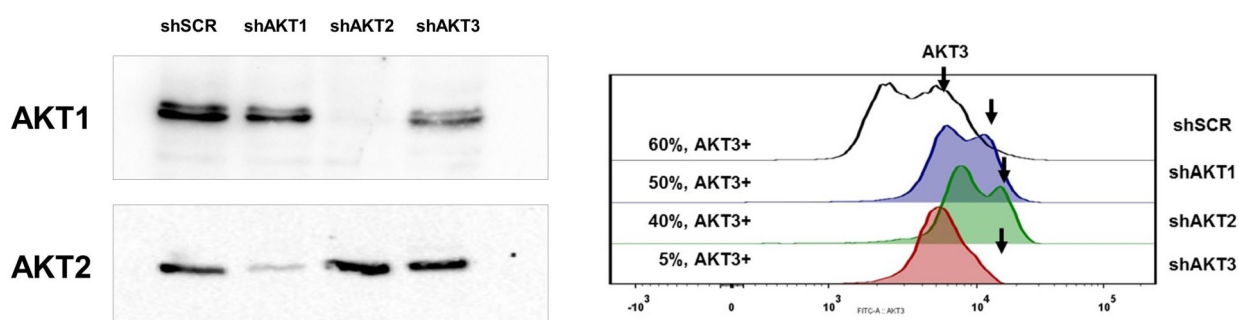


Figura 10. Izquierda, inmunoblot frente a AKT1 y AKT2 en células CRL1682/AsPC-1 expresando el short hairpin indicado en la zona superior. Derecha, gráfico de citometría de flujo que muestra la expresión de AKT3 en células CRL1682/AsPC-1 expresando el short hairpin indicado a la derecha.

RESULTADOS

1.1. La adaptación frente al silenciamiento individual de las isoformas de AKT en la línea de adenocarcinoma de páncreas CRL1682/AsPC-1 tiene un efecto diferencial sobre la proliferación y apoptosis

Las funciones de las isoformas de AKT en las células cancerosas no están bien caracterizadas, aunque sí que hay evidencia de que pueden ejercer actividades específicas en función del tipo tumoral. De hecho, a pesar de las altas similitudes en cuanto a estructura, en algunos tejidos se han descrito incluso funciones opuestas (Altomare DA *et al*, 2005; Arboleda MJ *et al*, 2003; Brown JS *et al*, 2016; Chen ML *et al*, 2006; Cheng JQ *et al*, 1992 y 1996; Cheng GZ *et al*, 2007; Chin YR *et al*, 2014; Davies MA *et al*, 2008; Dillon RL *et al*, 2009; Easton RM *et al*, 2005; Hollander MC *et al*, 2011; Hutchinson JN *et al*, 2004; Irie HY *et al*, 2005; Ju X *et al*, 2007; Kim D *et al*, 2001; Linnerth-Petrik NM *et al*, 2007; Liu H *et al*, 2006; Maroulakou IG *et al*, 2007; Nakatani K *et al*, 1999; Roy HK *et al*, 2002; Stahl JM *et al*, 2004; Tanno S *et al*, 2001; Virtakoivu R *et al*, 2012; Yoeli-Lerner M *et al*, 2005).

Para conocer su papel en el adenocarcinoma de páncreas y confirmar el efecto diferencial que sugerían los distintos fenotipos detectados, se realizó un estudio funcional de las células adaptadas al silenciamiento individual de dichas isoformas. En primer lugar estudiamos las tasas de proliferación y de apoptosis espontánea de acuerdo a la expresión de Ki-67 y por marcaje con anexina/propidio, respectivamente, ambos medidos por citometría de flujo. Dado que trabajamos con líneas celulares modificadas en un momento concreto, para tener en consideración variaciones que se pueden producir a lo largo del tiempo, se analizaron cultivos independientes de cada línea.

El silenciamiento de cualquiera de las 3 isoformas de AKT indujo un aumento altamente significativo ($p < 0.0001$) de la proporción de células apoptóticas en comparación con la línea control en los cultivos celulares. Al comparar las células modificadas entre sí, las líneas que expresaban shAKT1 y shAKT2 presentaban mayor apoptosis espontánea en comparación con shAKT3 (Figura 11).

RESULTADOS

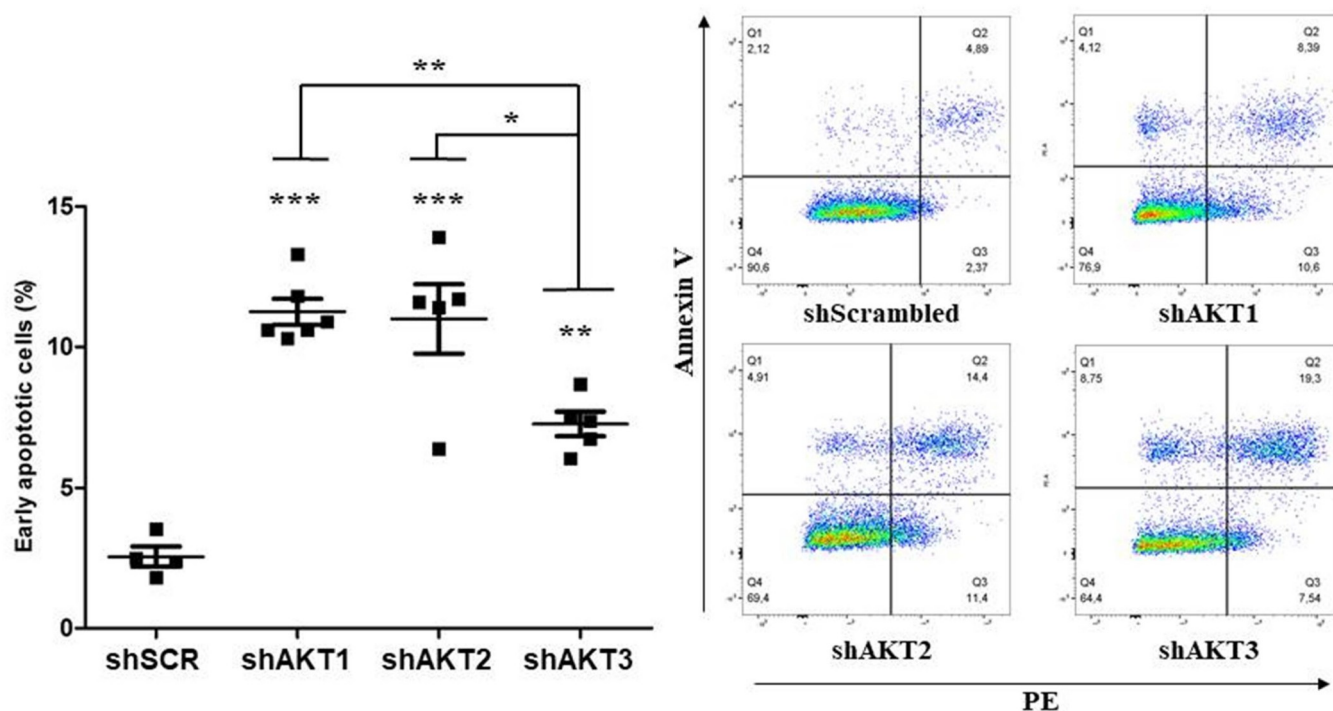


Figura 11. Izquierda, gráfico de puntos que representa la proporción de células en apoptosis (anexina V positivo/yoduro de propidio negativo) en las diferentes líneas celulares. Derecha, ejemplos de gráficos de citometría de flujo de tinción anexina V/yoduro de propidioropidio en cada línea celular estudiada. *, ** y *** representan diferencias significativas ($p < 0.05$), muy significativas ($p < 0.001$) y altamente significativas ($p < 0.0001$).

No se detectaron diferencias significativas respecto a la proliferación medida atendiendo a la expresión de Ki-67 entre las diferentes líneas celulares adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT, salvo un leve aumento de la proliferación en las células que expresaban shAKT2 y una disminución en shAKT3, cuyas diferencias sólo eran significativas al compararse entre ellas pero no con las demás (Figura 12)

RESULTADOS

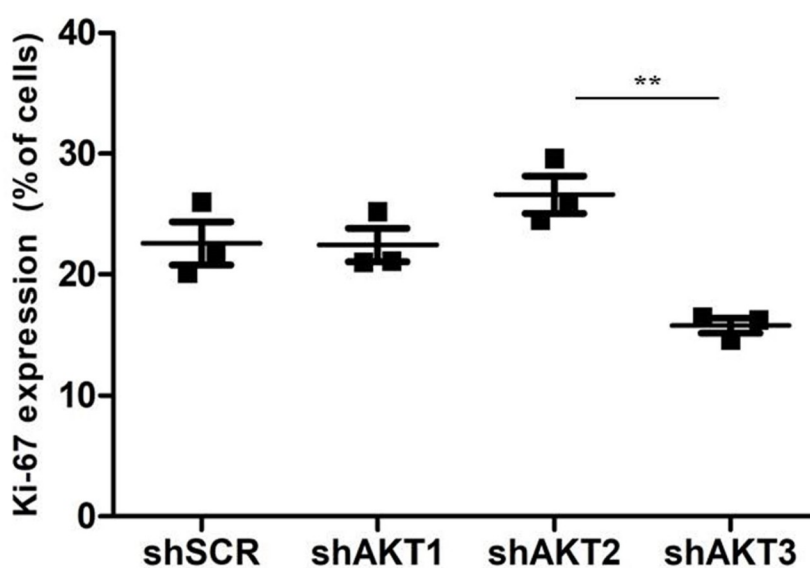


Figura 12. Gráfico de puntos representando la proporción de células que expresan Ki-67 en las diferentes líneas celulares, medido por citometría de flujo. ** representa una diferencias muy significativa ($p < 0.001$).

Una de las principales limitaciones de estas dos técnicas es que realizan la medición de proliferación y apoptosis en un momento concreto del tiempo y de forma aislada. Con la tecnología iCELLigence de Análisis Celular a Tiempo Real (RTCA, *Real Time Cell Analysis*, ACEA) ambas variables se presentan integradas y a tiempo real, por lo que se obtiene una información más global y representativa de la dinámica celular. Los experimentos de RTCA se realizaron con líneas celulares recientemente adaptadas al silenciamiento. Se pudo comprobar como en comparación con el control, las líneas modificadas no empezaban a proliferar hasta pasados 4-5 días, para después presentar un patrón de crecimiento irregular, con aceleraciones y deceleraciones de la velocidad (Figura 13A).

Cuando las células ya habían sido sometidas al menos a 10 pases en cultivo, y habían adquirido un crecimiento más constante, se repitió este experimento. En esta ocasión las curvas de crecimiento seguían la cinética exponencial habitual. La línea que expresaba shAKT1 presentaba una velocidad de crecimiento mayor incluso que el control. Por contra, las líneas con expresión de shAKT2 y shAKT3 crecían de forma significativamente más lenta que la línea control, alcanzándose una meseta en el crecimiento mucho antes de llegar a confluencia (Figura 13B).

Estos datos mostraron que las funciones de las isoformas de AKT no son completamente

RESULTADOS

redundantes en adenocarcinoma de páncreas, ya que el diferente comportamiento de las 3 líneas celulares indica que las rutas de adaptación a su silenciamiento son distintas. Las células modificadas presentan más apoptosis espontánea, sin grandes diferencias en cuanto a proliferación medida por Ki-67. El experimento de RTCA, sin embargo, indicó que la adaptación de las células al silenciamiento de AKT1 causa una aceleración del crecimiento celular incluso en comparación con la línea control, mientras que en el caso de AKT2 y AKT3 se observa un estancamiento de la proliferación.

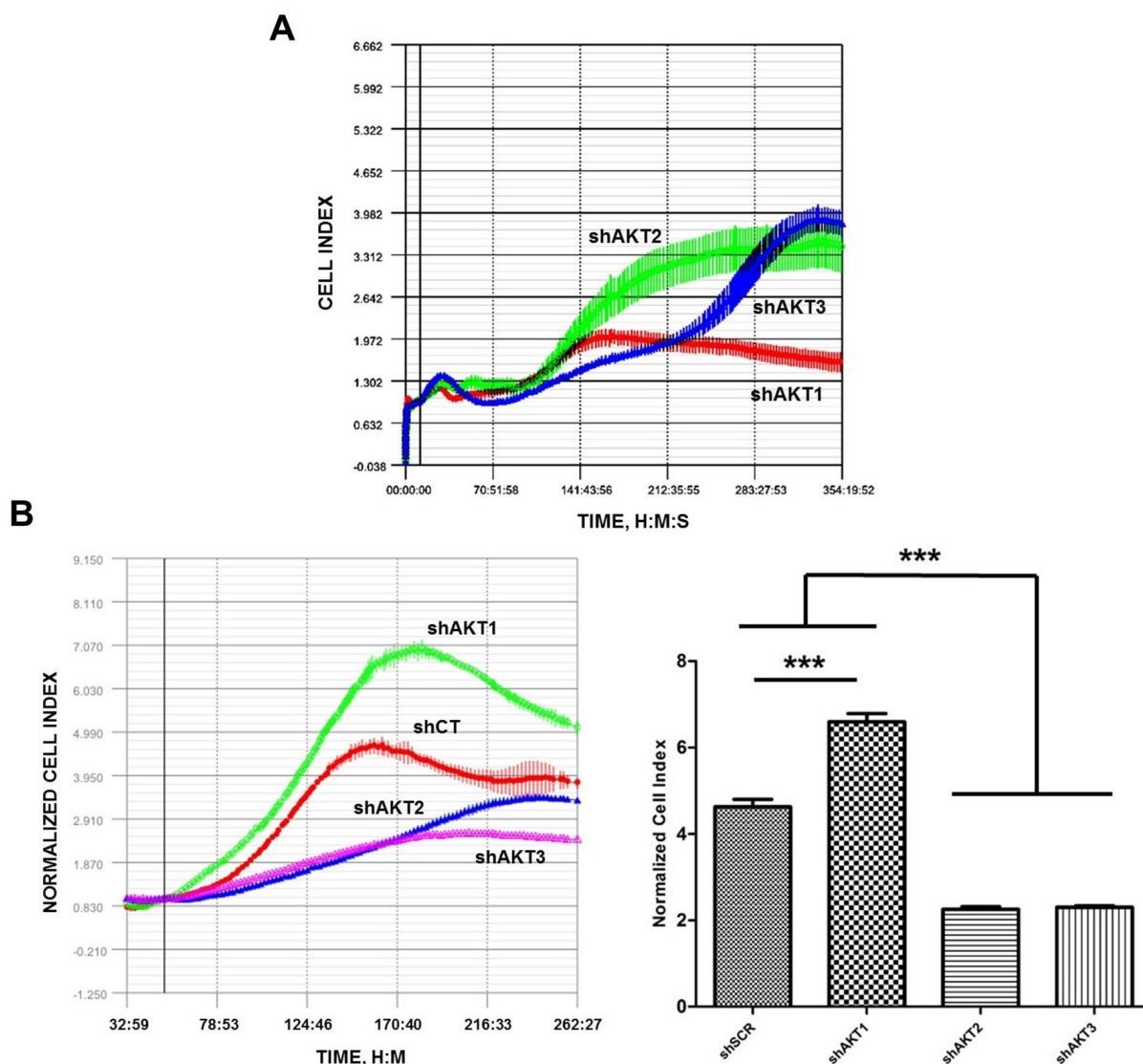


Figura 13. A: Gráfico de RTCA representando el crecimiento celular en las líneas recientemente transducidas con los ARN interferentes frente a AKT1, AKT2 y AKT3, medido por Índice Celular (*Cell Index*, CI) en función del tiempo. Las barras verticales representan los intervalos de confianza al 95%. B: Izquierda, gráfico de RTCA representando el crecimiento celular en las líneas que expresan shAKT1, shAKT2 y shAKT3 y la línea control, con un mínimo de 10

RESULTADOS

pases tras el silenciamiento, medido por Índice Celular Normalizado (Normalized *Cell Index*, NCI) en función del tiempo. Derecha, gráfico de puntos representando la comparativa *** representa una diferencia altamente significativas ($p < 0.0001$).

2. ESTUDIOS DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA DIFERENCIAL

Como ya se ha indicado anteriormente, los ensayos clínicos con fármacos que bloquean la vía PI3K/AKT/mTOR no han obtenido resultados positivos en adenocarcinoma de páncreas, a pesar de que estas proteínas juegan un papel fundamental en esta patología¹¹³⁻¹¹⁷. Dado que las vías moleculares relacionadas con la adaptación a la inhibición de AKT no están bien caracterizadas, y por lo tanto tampoco las específicas de cada isoforma, se llevó a cabo una evaluación de la expresión proteica en cada línea celular mediante estudios de proteómica cuantitativa. De esta forma se podrían conocer con un nivel de detalle muy elevado las rutas que se alteran como mecanismo de resistencia a terapias dirigidas frente a AKT, así como las proteínas que interactúan con sus diferentes isoformas. Estos estudios podrían sugerir combinaciones de fármacos que actúen a la vez a nivel de esta vía y frente a las rutas de resistencia y que puedan ser especialmente efectivas al interferir con la capacidad de adaptación de las células.

Los proteomas de las líneas adaptadas se compararon con el de la línea control expresando un shARN inespecífico como referencia común. Se identificaron 3930 proteínas con una tasa de descubrimiento de falsos positivos (FDR, *false discovery rate*) inferior al 1%. En la línea shAKT1 se identificaron 115 proteínas expresadas de forma diferencial (mayor en 57, menor en 58), 179 en shAKT2 (mayor en 78, menor en 101) y 191 en shAKT3 (mayor en 88, menor en 93). El grado de solapamiento entre las 3 líneas fue bajo, con sólo 16 (10.7%) proteínas sobreexpresadas y 4 (2.2%) infraexpresadas de forma común (Figura 14).

Por lo tanto, el silenciamiento individual mantenido de cada isoforma de AKT indujo perfiles de expresión proteica específicos (figura 15) con un bajo grado de solapamiento, indicando funciones no redundantes de estas proteínas en adenocarcinoma de páncreas.

RESULTADOS

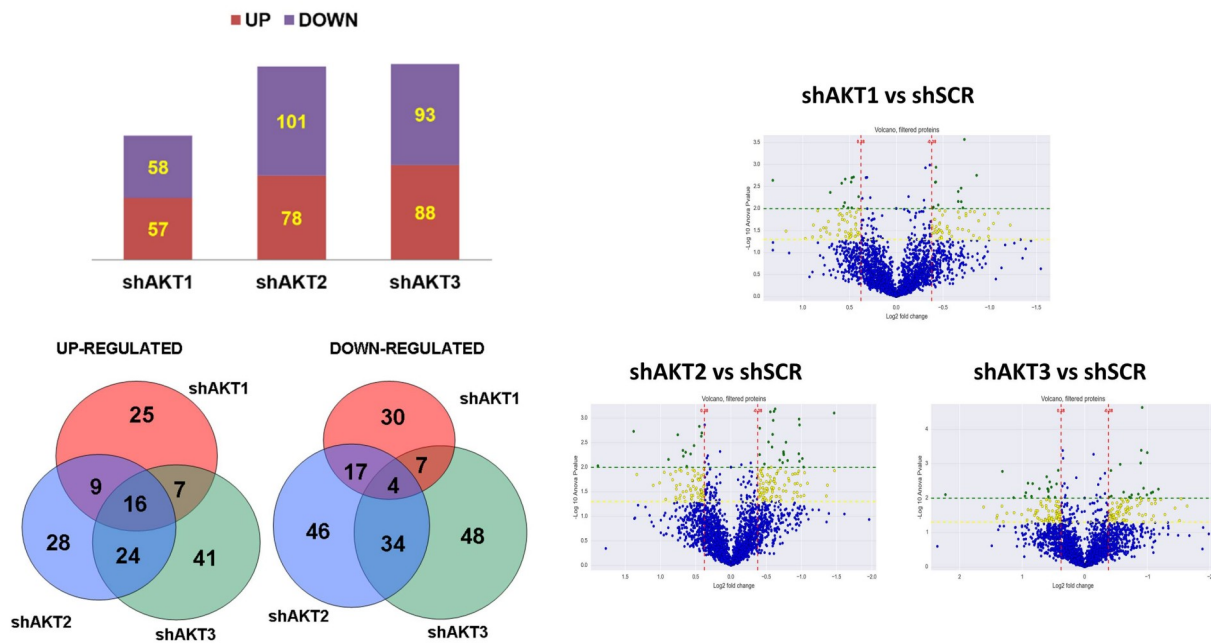


Figura 14. Izquierda arriba, gráficos de barras representando el número de proteínas con expresión aumentada (rojo) o disminuida (azul) en líneas celulares que expresan el shARN indicado, en comparación con la línea control. Izquierda abajo, diagramas de Venn de las proteínas diferencialmente expresadas en cada una de dichas líneas; los solapamientos se muestran junto con el número de proteínas identificadas. Derecha, gráficos volcán que muestran la significación de las diferencias para cada proteína identificada en cada comparación por parejas indicadas en la zona superior. En azul, cambios no significativos; en amarillo, cambios significativos con $p < 0.05$; en verde, cambios significativos con $p < 0.01$.

RESULTADOS

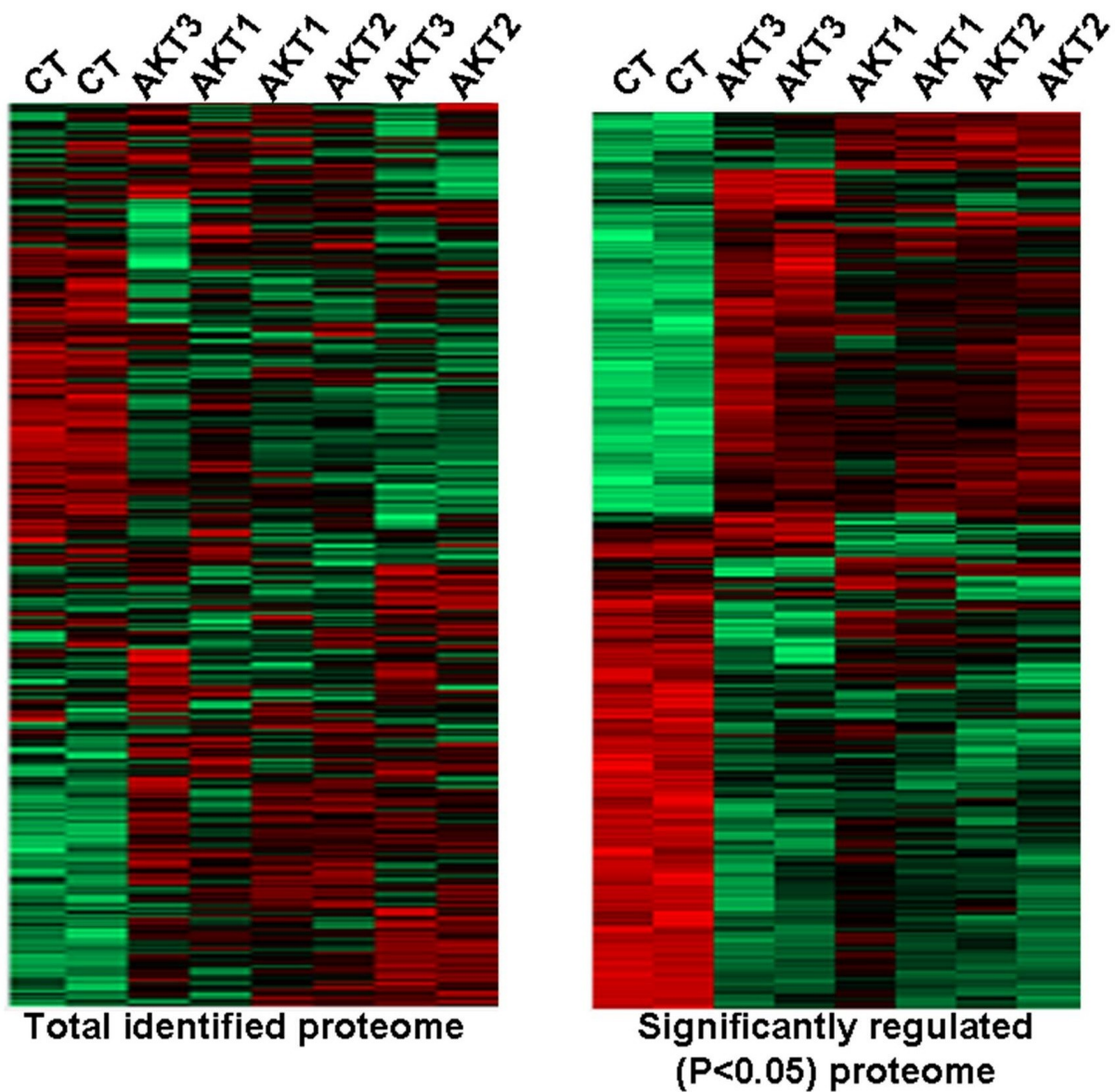


Figura 15. Izquierda, mapa de calor representando las diferencias cuantitativas en la expresión de proteínas entre el control y las líneas celulares en las que se ha silenciado la isoforma de AKT indicada en la parte superior. Derecha, mapa de calor representando las diferencias cuantitativas en la expresión de proteínas entre el control y las líneas celulares en las que se ha silenciado la isoforma de AKT indicada en la parte superior, sólo incluyendo aquellas proteínas en las que se han objetivado cambios estadísticamente significativos ($P < 0.05$). En rojo, proteínas con expresión aumentada; en verde, proteínas con expresión disminuida; en negro, sin cambios en la expresión.

RESULTADOS

2.1. Interactomas funcionales específicos a partir de las proteínas diferencialmente sobreexpresadas en cada línea celular

Dada la alta complejidad de los datos obtenidos mediante los estudios de proteómica, con alteraciones en la expresión de un gran número de proteínas, se llevó a cabo una reconstrucción de las rutas moleculares alteradas utilizando la plataforma STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*). De esta forma se obtiene una visión panorámica de los cambios funcionales que se han producido en las células como consecuencia de la adaptación al silenciamiento individual de cada isoforma de AKT.

Inicialmente se diseñaron los interactomas utilizando únicamente las proteínas cuya expresión estaba aumentada, para así estudiar las funciones que las células de adenocarcinoma de páncreas potenciaban como mecanismo de resistencia y escape.

Las células adaptadas al silenciamiento de AKT1 presentaban la activación de 5 rutas (Figura 16). Tres de ellas estaban relacionadas con la mitocondria, incluyendo la oxidación de ácidos grasos, respiración mitocondrial, producción de ATP, y replicación de ADN mitocondrial. El resto de proteínas estaban relacionadas con el procesamiento de los ARNm, principalmente con el complejo regulador del procesamiento de ARN o *splicing* (*spliceosoma*) y con la biogénesis de ribosomas y traducción de proteínas. Además se detectó el aumento de la expresión de proteínas como *Late Endosomal/Lysosomal Adaptor*, *MAPK And MTOR Activator 1* (LAMTOR1) relacionadas con la vía PI3K/AKT/mTOR.

RESULTADOS

intrones de los ARNm (*splicing*), la actividad de las histona deacetilasas, y por lo tanto la regulación de la expresión génica, el plegamiento proteico, adhesión celular y migración.

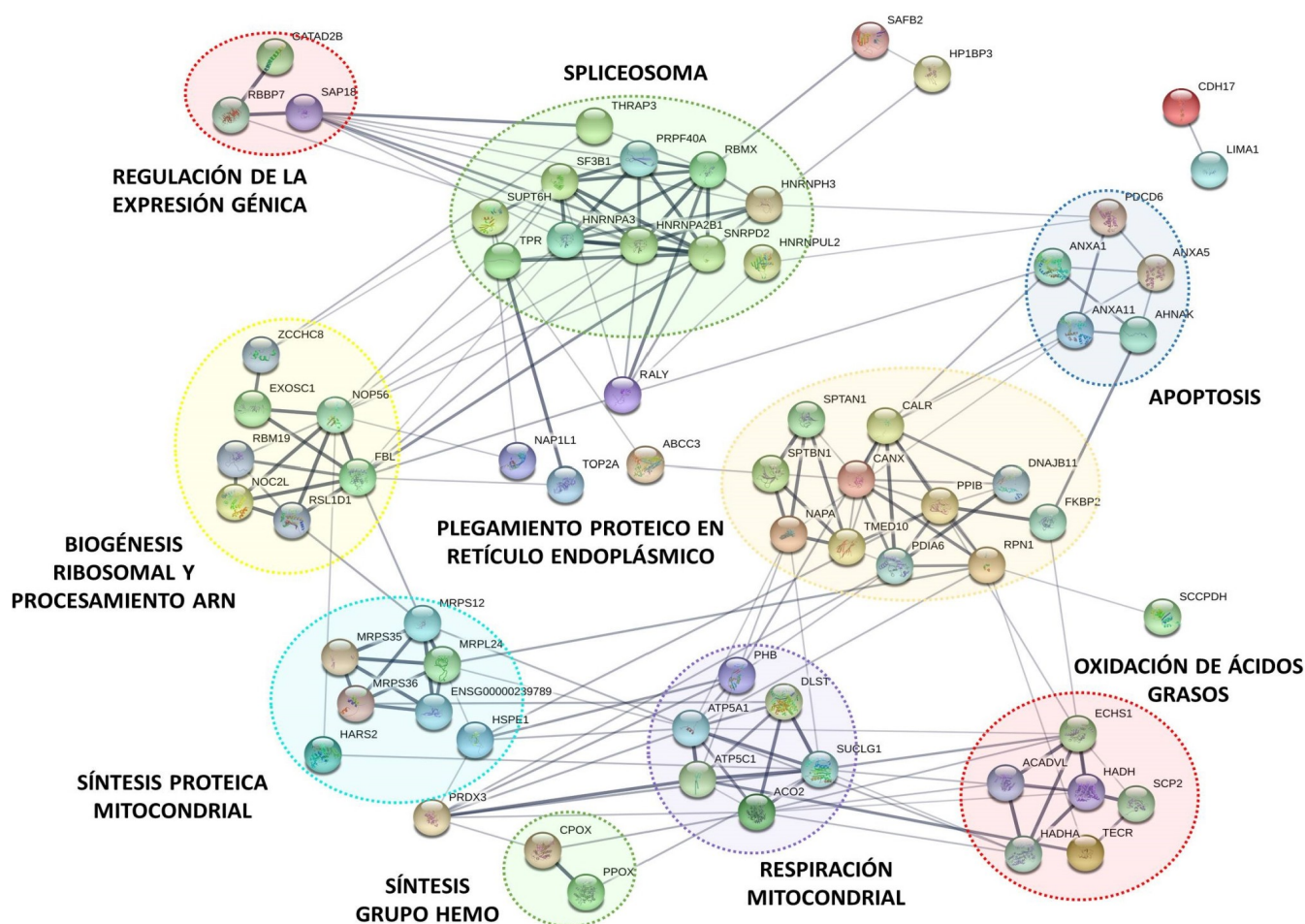


Figura 17. Interactoma funcional de las proteínas sobreexpresadas tras la adaptación al silenciamiento de AKT2. En círculos se muestran agrupadas las proteínas según función celular o vía molecular. El grosor de la línea es proporcional a la fiabilidad de las interacciones propuestas de acuerdo con la evidencia que apoya las interacciones entre los nodos.

Por último, el perfil de expresión proteica de las líneas resistentes al silenciamiento de AKT3 mostraba bastante similitud con el de AKT2 (Figura 18). Las funciones mitocondriales aumentadas fueron las mismas, incluyendo además un aumento en expresión de un gran número de proteínas relacionadas con el *spliceosoma* o con plegamiento proteico. También en esta línea celular se encontraron un número significativo de proteínas de expresión aumentada implicadas en regulación génica, y más concretamente que forman parte o interaccionan con las histona-deacetilasas. Este

RESULTADOS

hecho sugería una regulación génica dependiente de la reducción de la capacidad de unión de las histonas al ADN, permitiendo un mayor desempaquetamiento de la cromatina y por lo tanto probablemente favoreciendo la transcripción génica.

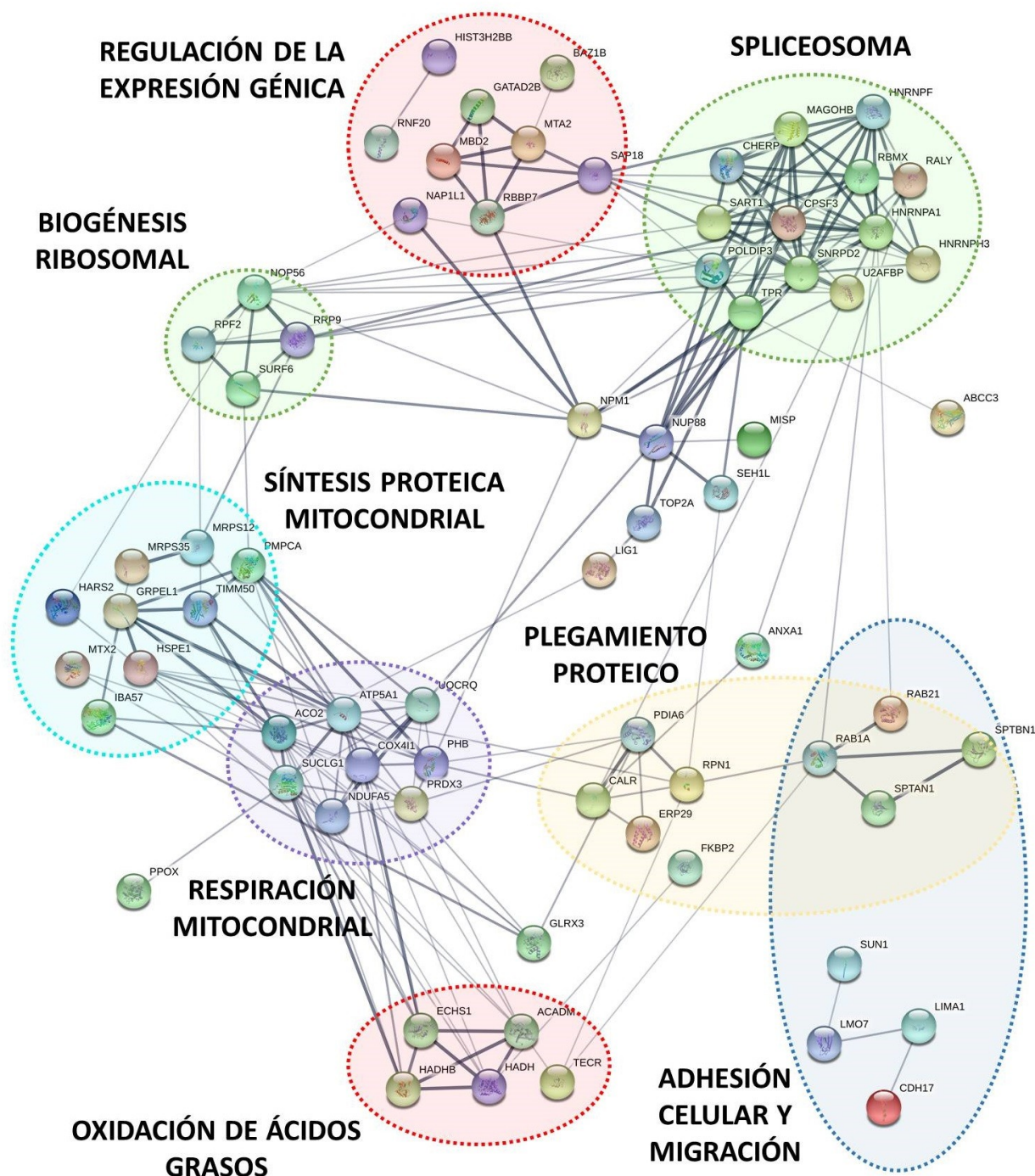


Figura 18. Interactoma funcional de las proteínas sobreexpresadas tras la adaptación al silenciamiento de AKT3. En círculos se muestran agrupadas las proteínas según función celular o vía molecular. El grosor de la línea es proporcional a la fiabilidad de las interacciones propuestas de acuerdo con la evidencia que apoya las interacciones entre los nodos.

RESULTADOS

Como conclusión, se observaron cambios muy profundos afectando funciones mitocondriales como la fosforilación oxidativa, la síntesis de ATP, la oxidación de ácidos grasos o la síntesis proteica mitocondrial. Estos cambios estarían reflejando los mecanismos de adaptación frente al silenciamiento individual de cualquiera de las isoformas de AKT en células de adenocarcinoma de páncreas. En el caso de AKT1 cobran una relevancia incluso mayor, dado que la mayor parte de las vías moleculares asociadas a dicha adaptación están relacionadas con la mitocondria, sugiriendo una importante dependencia de esta organela. En la adaptación al silenciamiento de AKT2 y AKT3 parecen participar otras rutas de señalización similares, destacando el procesamiento del ARNm o *splicing*, los ribosomas o el plegamiento proteico, sugiriendo un aumento significativo de la síntesis proteica.

2.2. Interactomas funcionales específicos a partir de las proteínas diferencialmente infraexpresadas en cada línea celular

El mismo proceso de reconstrucción de interactomas mediante STRING se llevó a cabo también con las proteínas cuya expresión estaba disminuida en las células adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT, para así tener una visión global de la reprogramación acontecida en las células tras su modificación.

En el caso de la adaptación al silenciamiento de AKT1, se identificaron 3 núcleos principales que agrupaban a gran parte de las proteínas. Sin embargo hay que destacar que el número de nodos aislados con funciones no relacionadas fue relativamente alto (Figura 19). El mayor de estos grupos funcionales infraexpresados estaba relacionado con la supervivencia celular, lo que concuerda con el aumento de la apoptosis espontánea en esta línea celular observado por citometría de flujo. También disminuyó la expresión de proteínas relacionadas con la síntesis de glutatión, y de proteínas que participan en la regulación del citoesqueleto y la migración celular.

RESULTADOS

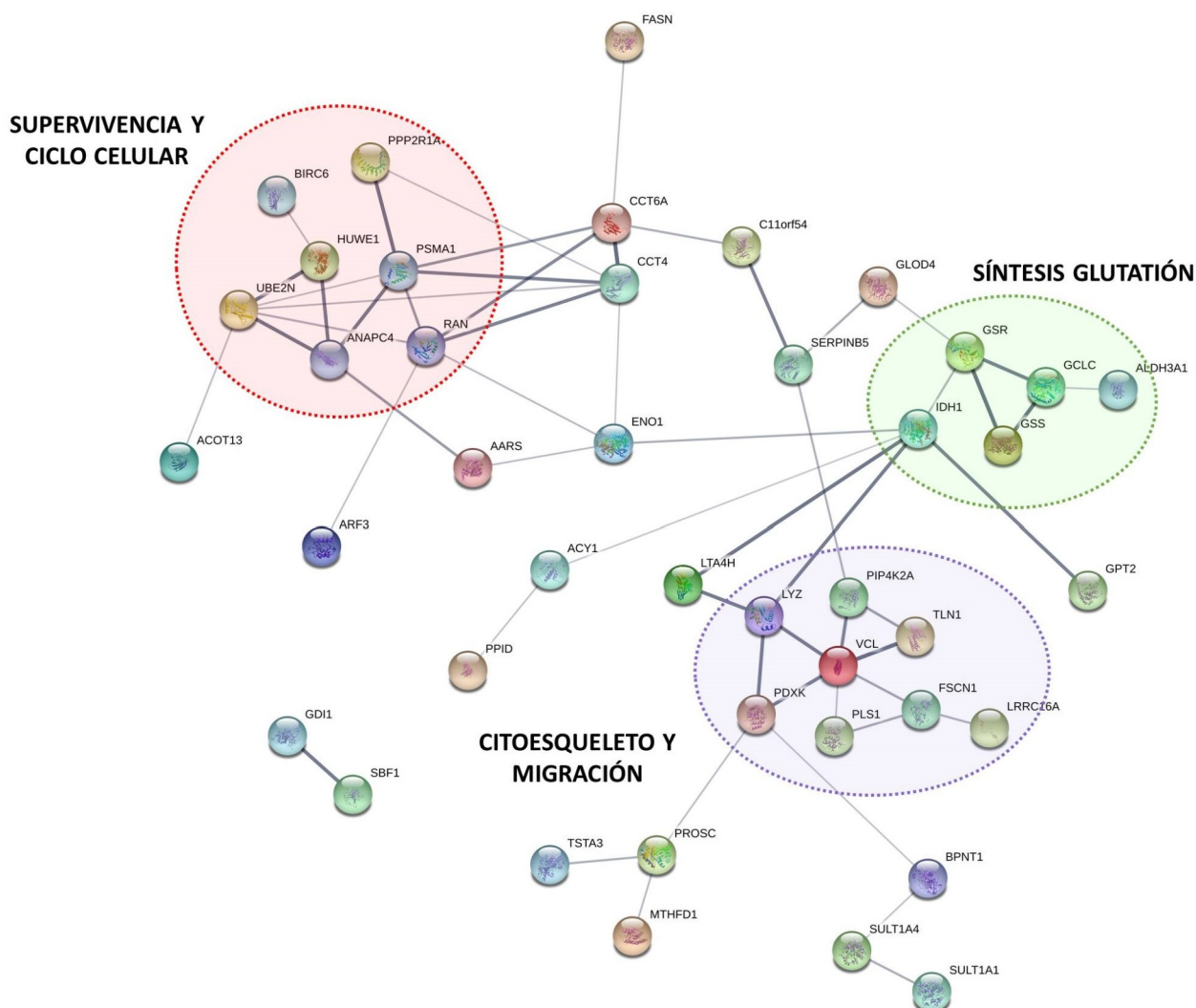


Figura 19. Interactoma funcional de las proteínas infraexpresadas tras la adaptación al silenciamiento de AKT1. En círculos se muestran agrupadas las proteínas según función celular o vía molecular. El grosor de la línea es proporcional a la fiabilidad de las interacciones propuestas de acuerdo con la evidencia que apoya las interacciones entre los nodos.

Respecto a la adaptación al silenciamiento de AKT2, la red generada es mucho más compleja y afecta a funciones celulares relacionadas con diferentes organelas (Figura 20). Se encuentra disminuida la expresión de múltiples proteínas relacionadas con la glicolisis y la ruta de las pentosas fosfato, lo que junto con la recuperación de la función mitocondrial apoya una reversión del efecto Warburg. También están inhibidas la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, ubiquitinización y degradación por el proteasoma, migración celular, además de varias moléculas relacionadas con la ruta RAS/RAF/MEK/ERK.

RESULTADOS

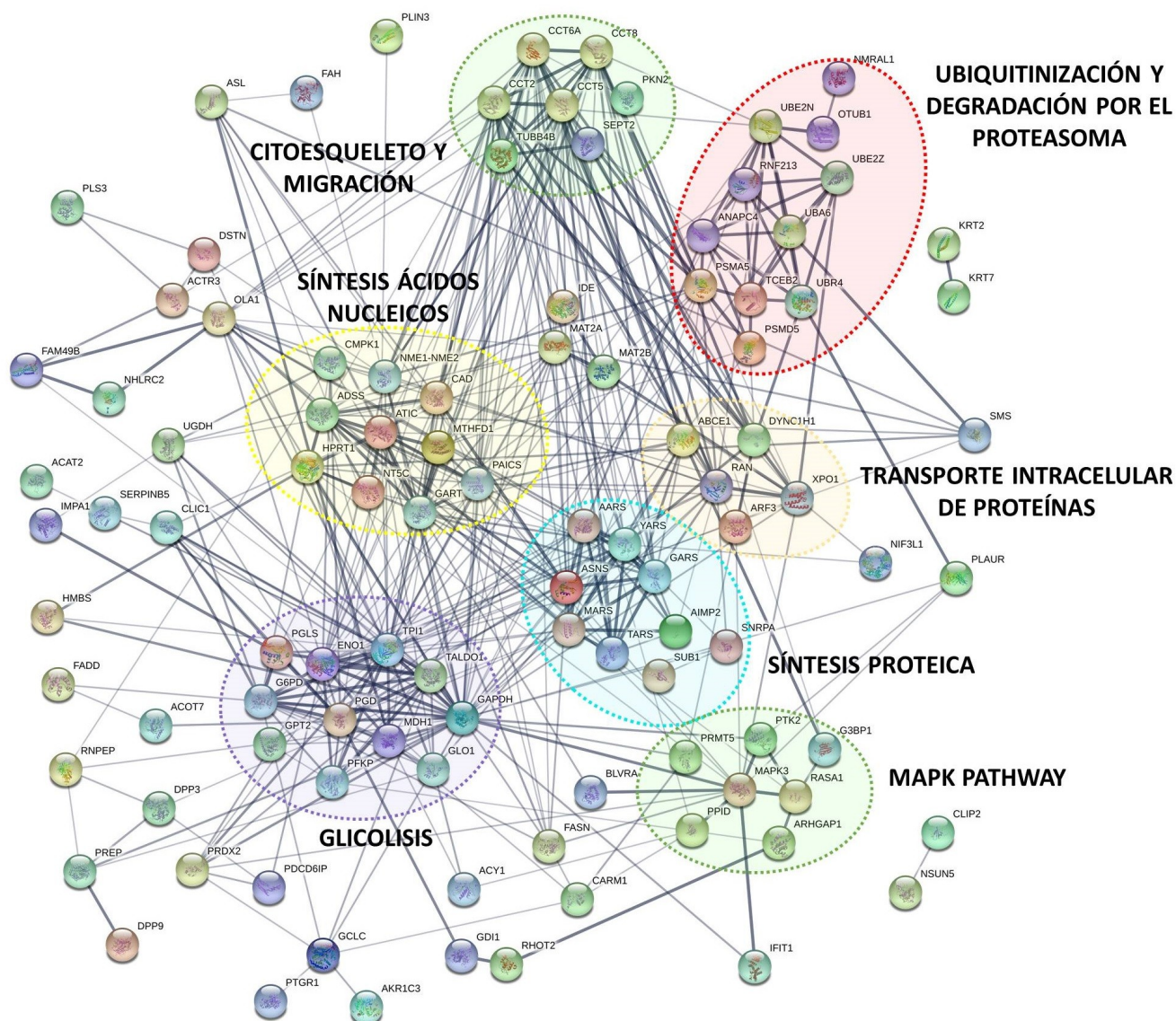


Figura 20. Interactoma funcional de las proteínas infraexpresadas tras la adaptación al silenciamiento de AKT2. En círculos se muestran agrupadas las proteínas según función celular o vía molecular. El grosor de la línea es directamente proporcional a la fuerza de la evidencia.

Finalmente, el interactoma generado a partir de las proteínas cuya expresión está disminuida tras la adaptación al silenciamiento de AKT3 guarda bastantes similitudes con la de AKT2 (Figura 21). Un número considerable de las proteínas relacionadas con la glicolisis y la ruta de las pentosas fosfato se infraexpresan de manera común en las dos líneas celulares, así como las que intervienen en la degradación por el proteasoma, la síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos. También se observa una disminución de proteínas con gran relevancia en la protección contra la oxidación.

RESULTADOS

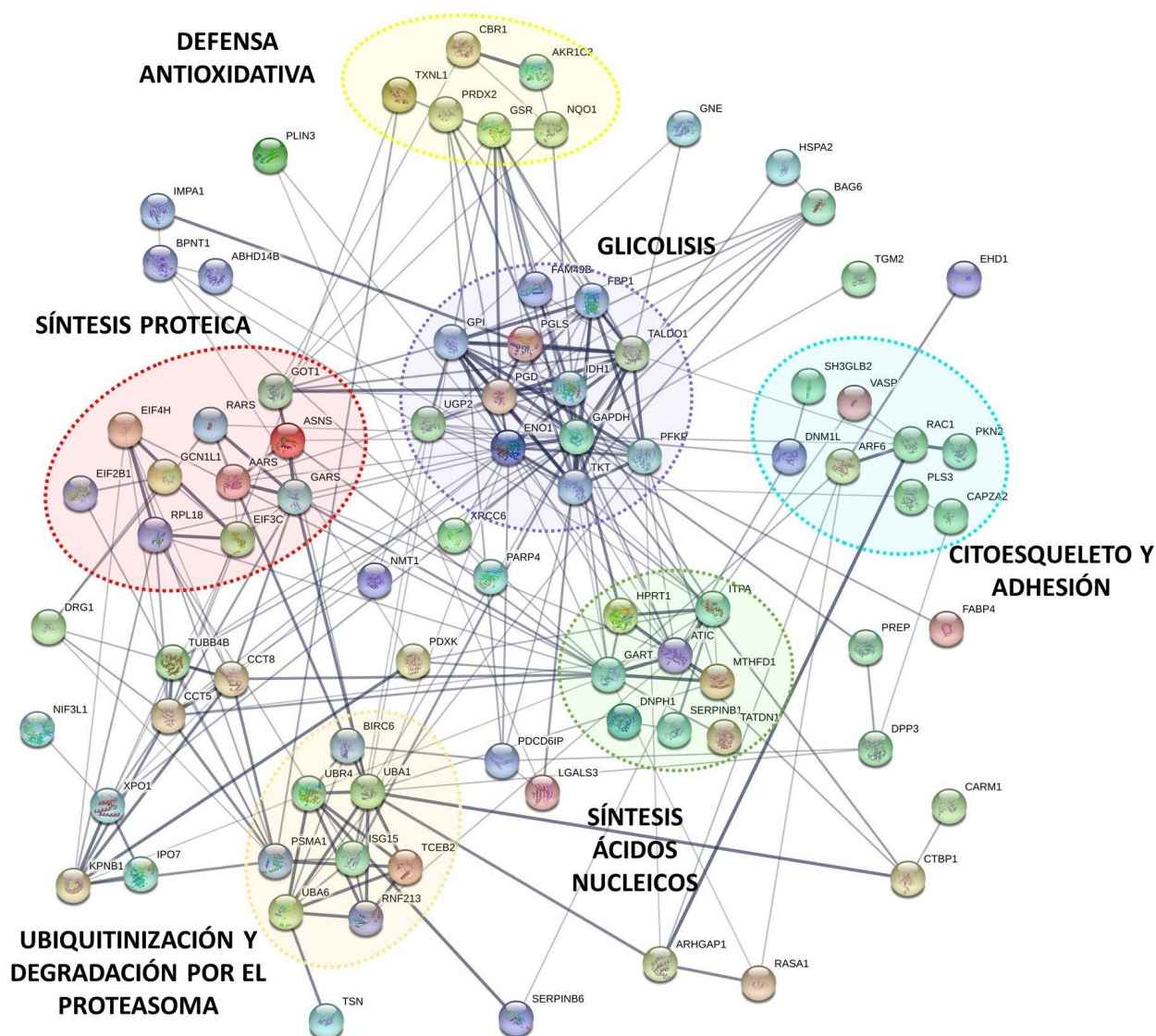


Figura 21. Interactoma funcional de las proteínas infraexpresadas tras la adaptación al silenciamiento de AKT3. En círculos se muestran agrupadas las proteínas según función celular o vía molecular. El grosor de la línea es proporcional a la fiabilidad de las interacciones propuestas de acuerdo con la evidencia que apoya las interacciones entre los nodos.

Como conclusión, la inhibición individual sostenida de las isoformas de AKT en células de adenocarcinoma de páncreas y la posterior adaptación a este silenciamiento induce perfiles de expresión proteica específicos de cada isoforma, lo que sugiere de esta manera que las isoformas de AKT tienen diversas funciones diferenciales en esta línea humana de adenocarcinoma de páncreas. A pesar de que la mayor parte de las proteínas cuya expresión se encuentra alterada no son comunes para la adaptación al silenciamiento de las 3 isoformas de AKT, sí que comparten gran parte de las funciones celulares afectadas. Entre ellas destaca el aumento de la actividad mitocondrial y la disminución de la glicolisis y de la ruta de las pentosas fosfato, lo que sugiere un cambio en el

RESULTADOS

metabolismo celular como forma de adaptación, con una reversión del efecto Warburg, pasando a ser la mitocondria la principal fuente de energía en la célula tumoral.

2.3. Interactomas funcionales integrados obtenidos con Ingenuity Pathway Analysis

Para integrar y representar los cambios en la expresión de proteínas detectados en las líneas adaptadas al silenciamiento individual de las isoformas de AKT se utilizó el software Ingenuity Pathway Analysis, que integra interactomas funcionales que contienen simultáneamente proteínas sobre e infraexpresadas.

En el caso de AKT1, el aumento de la expresión de ATP5H (*ATP Synthase Peripheral Stalk Subunit D*), ATP5A1 (*ATP Synthase F1 Subunit Alpha*), NDUFA12 (*NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit A12*), DLST (*Dihydrolipoamide S-Succinyltransferase*), DLD (*Dihydrolipoamide Dehydrogenase*), ALDH2 (*Aldehyde dehydrogenase*), VDAC1/2 (*Voltage-dependent anion-selective channel 1*), PPOX (*Protoporphyrinogen Oxidase*), IMMT (*Inner Membrane Mitochondrial Protein*), así como la predicción de citocromo C, necesario para la síntesis de ATP, apoyan la alta dependencia del metabolismo mitocondrial de esta línea celular (Figura 22). Otras moléculas predichas fueron ERK1/2 (*Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*), SOS1 (*SOS Ras/Rac Guanine Nucleotide Exchange Factor 1*) y ARDB (*Antirestriction Protein*), sugiriendo un papel importante de la vía RAS/RAF/MEK/ERK. También se detectó una menor expresión de GAK (*Cyclin-G-associated kinase*), que se ha relacionado con sobreexpresión de EGFR, la cual a su vez ya ha sido detectada previamente en células con silenciamiento de AKT1 (Virtakoivu R *et al*, 2012; Zhang L *et al*, 2004).

RESULTADOS

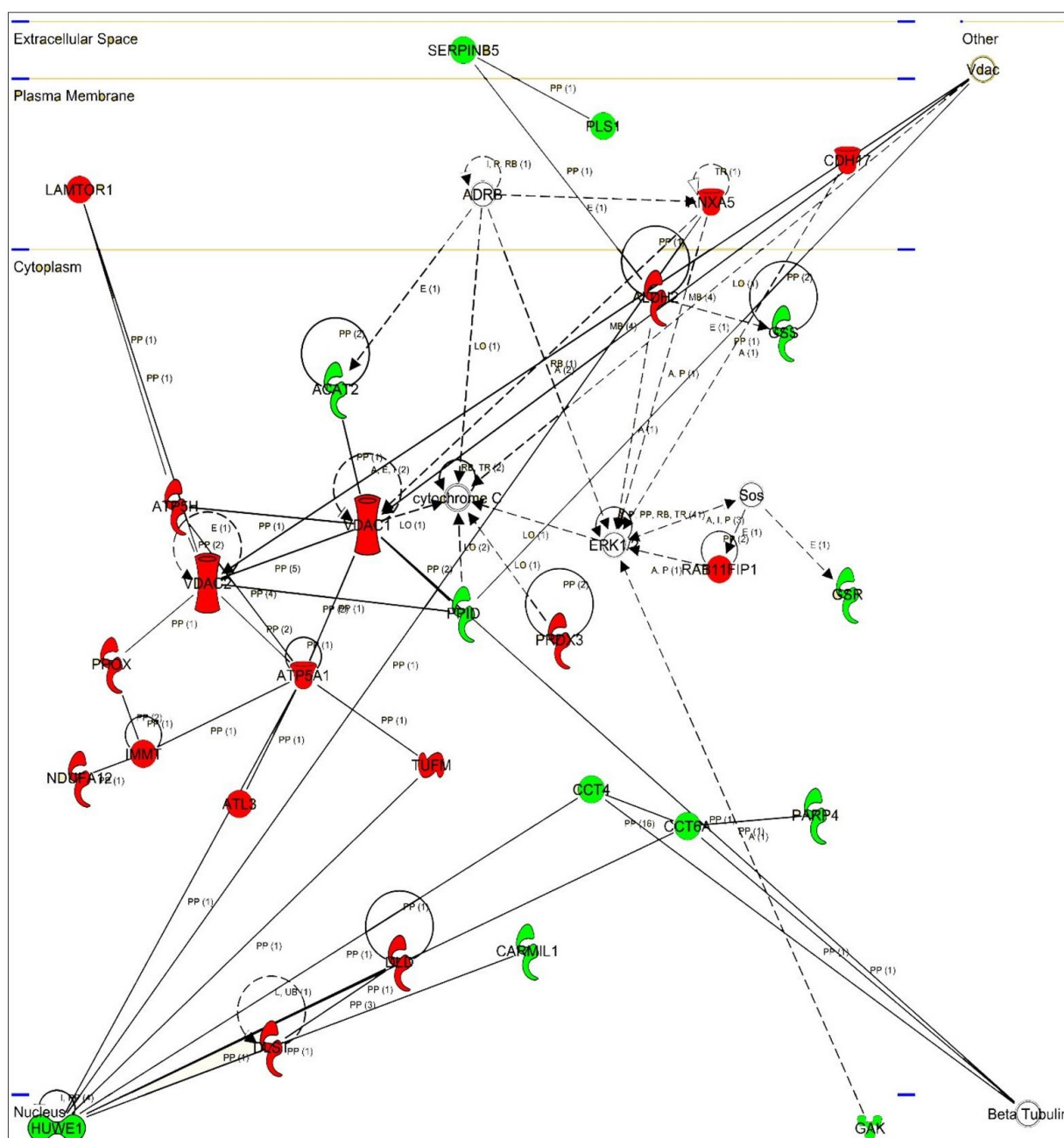
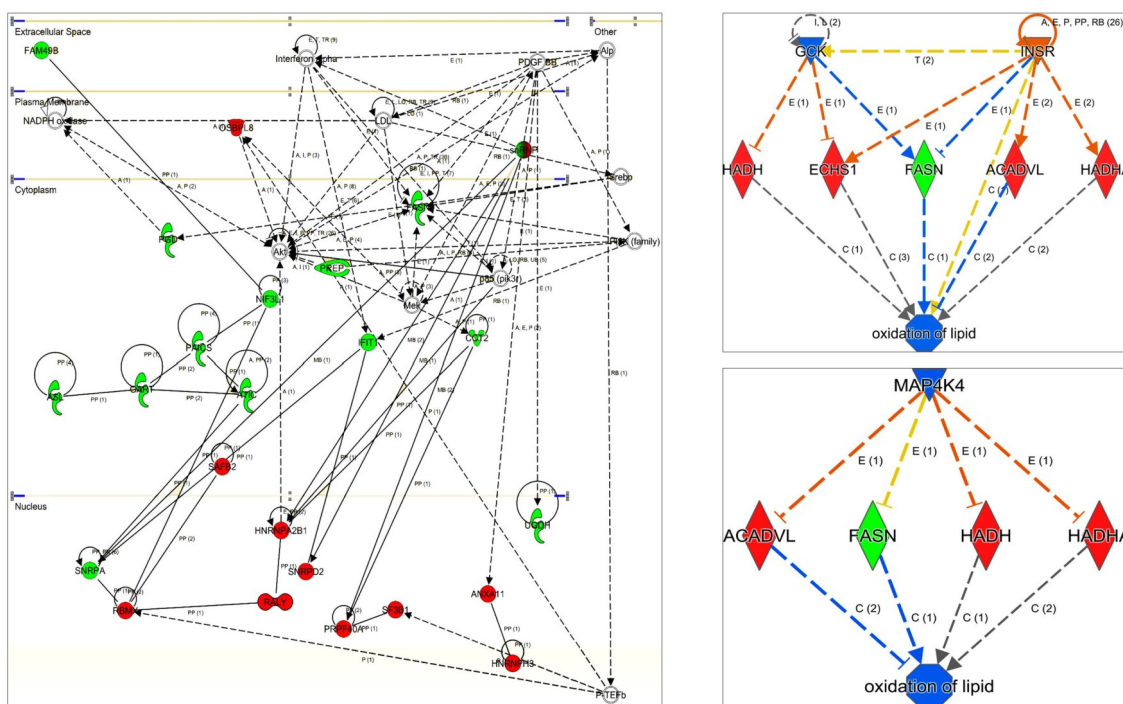


Figura 22. Interactoma funcional generado con Ingenuity Pathway Analysis utilizando proteínas expresadas de forma diferencial al comparar shCT y shAKT1. Nodo en rojo representa aumento de la expresión. Nodo en verde representa disminución de la expresión. A: activación. B: unión. C: causa/induce. CC: interacción químico-químico. CP: interacción químico-proteína. E: expresión: EC: catálisis de enzima. I: inhibición. L: proteólisis. LO: localización. M: modificación bioquímica. MB: grupo/complejo. P: fosforilación. PD: unión proteína-ADN. PP: unión proteína-proteína. PR: unión proteína-ARN. RB: regulación de la unión. RE: reacción. RR: unión ARN-ARN. T: transcripción. TR: translocación. Flecha continua: interacción directa. Flecha discontinua: interacción indirecta.

RESULTADOS

Respecto a las células adaptadas a la inhibición de AKT2, el interactoma generado por Ingenuity indica un incremento del procesamiento del pre-mRNA o *splicing* por el aumento de expresión de HNRNPH3, SF3B1, PRPF40A, RALY, SNRPD2, HNRNPA2B1 o RBMX (Figura 23). El *splicing* alternativo se ha relacionado con tumorigénesis, progresión y metástasis en diferentes tipos celulares. Por otro lado se predijeron moléculas principales de la vía PI3K/AKT, quizá apoyando una reactivación de esta ruta por un mecanismo dependiente de las otras isoformas de AKT.

Las redes de efectos de regulación mostraron una relación directa entre la adaptación al silenciamiento de AKT2 y la oxidación mitocondrial de lípidos, probablemente como mecanismo compensatorio de una menor utilización de glucosa para biogénesis y obtención de ATP (Raulien N *et al*, 2017). En la red situada en la parte superior, los reguladores de mayor orden (*upstream*) como GCK (*Glucokinase*) e INSR (*Insulin Receptor*) están íntimamente relacionados con el metabolismo de la glucosa, y su inactivación favorece la oxidación de ácidos grasos como fuente de ATP y NADPH. INSR es además un receptor tirosin-quinasa que activa las vías PI3K/AKT/mTOR y RAS/RAF/MEK/ERK tras unión a sus ligandos. La red inferior predice el papel de NIK (*NF-kappa-B-inducing kinase*) en potenciar la oxidación de ácidos grasos, pero esta molécula también se relaciona con muchas otras funciones, entre ellas la ruta de las MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) o NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa B*).



RESULTADOS

Figura 23. Izquierda, interactoma funcional generado con Ingenuity Pathway Analysis utilizando proteínas expresadas de forma diferencial al comparar shCT y shAKT2. Significado de los símbolos como en figura 22. Derecha, redes de efectos de regulación predichos.

Dos interactomas de Ingenuity se diseñaron a partir de la adaptación a la inhibición de AKT3 (Figura 24). Al igual que en el caso de AKT2, el *splicing* se encontraba potenciado, al detectarse un aumento de la expresión de SART1 (*Spliceosome Associated Factor 1, Recruiter Of U4/U6.U5 Tri-SnRNP*), CHERP (*Calcium Homeostasis Endoplasmic Reticulum Protein*), HNRNPF (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein F) y HNRNPH3 (*Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H3*), y moléculas relacionadas con la transcripción del ADN como la ARN polimerasa II o CK2 (*Casein Kinase 2*) fueron predichas como nodos participantes en los interactomas. También la ruta PI3K/AKT tiene un papel fundamental, siendo PI3K uno de los nodos pronosticados, mientras que la infrarregulación de TGM2 (*Tissue transglutaminase*) sugiere que RAS/RAF/MEK/ERK no es una de las rutas de escape.

Un alto número de proteínas detectadas se relacionan con la transición epitelio-mesénquima y limitan este fenómeno, como por ejemplo el aumento de la expresión de LMO7 (*LIM Domain 7*) (Thomson S *et al*, 2011) o de LIMA1 (*LIM Domain And Actin Binding 1*) (Zhang S *et al*, 2011), entre otras relacionadas con la migración y el citoesqueleto. Además varias de las moléculas predichas como actina, alfa-catenina o la propia vía Notch están íntimamente relacionadas. Por último, la mayor expresión de MBD2 (*Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*), MTA2 (*Metastasis Associated 1 Family Member 2*), GATAD2B (*GATA Zinc Finger Domain Containing 2B*), TOP2A (*DNA Topoisomerase II Alpha*), SAP18 (*Sin3A Associated Protein 18*) o POLDIP3 (*Polymerase delta-interacting protein 3*), además de la propuesta de NuRD (Nucleosome Remodeling Deacetylase) o histona H4, son indicativos de una mayor regulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos.

RESULTADOS

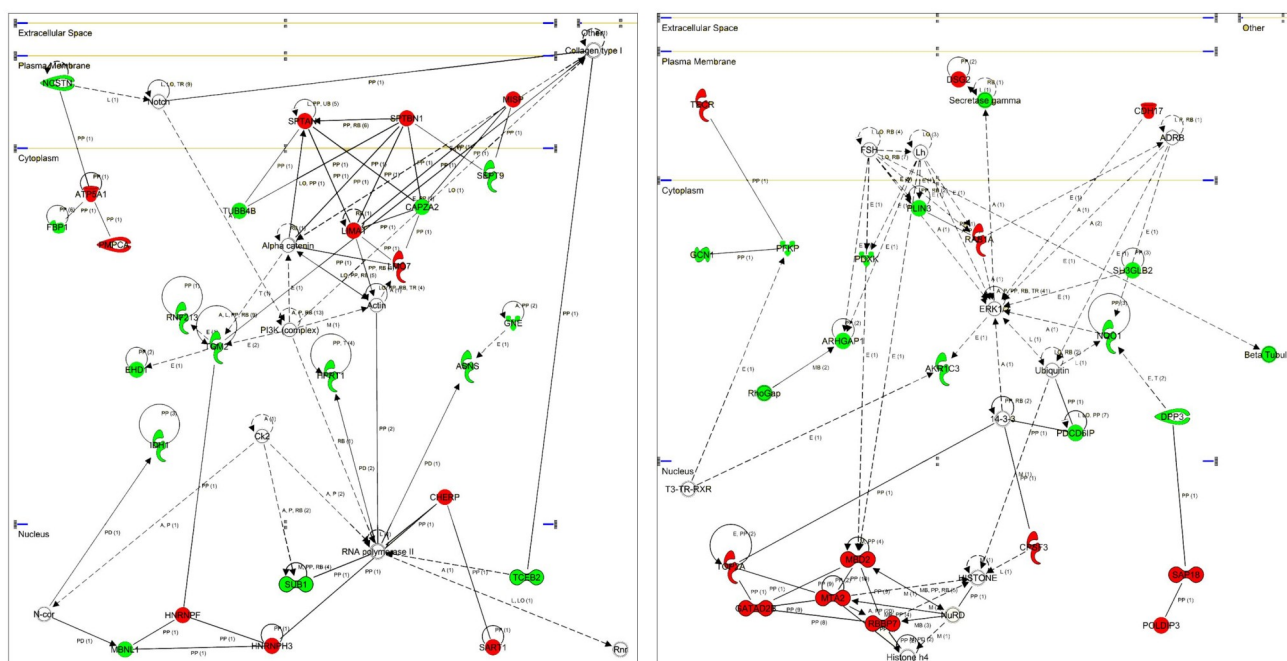


Figura 24. Interactomas funcionales generados con Ingenuity Pathway Analysis utilizando proteínas expresadas de forma diferencial al comparar shCT y shAKT3. Significado de los símbolos como en figura 22.

Las redes de efectos de regulación de la adaptación al silenciamiento de AKT3 comparten con AKT2 a GSK e INSR como moléculas corriente arriba, y la oxidación de lípidos como función celular relacionada. Además, se identificaron 2 funciones adicionales; hidrólisis de nucleótidos y viabilidad de las células tumorales, esta última disminuida debido a la menor expresión de XRCC6 (*X-Ray Repair Cross Complementing 6*), RAC1 (*Rac Family Small GTPase 1*), RASA1 (*RAS P21 Protein Activator 1*) y EIF3C (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 3 Subunit C*).

RESULTADOS

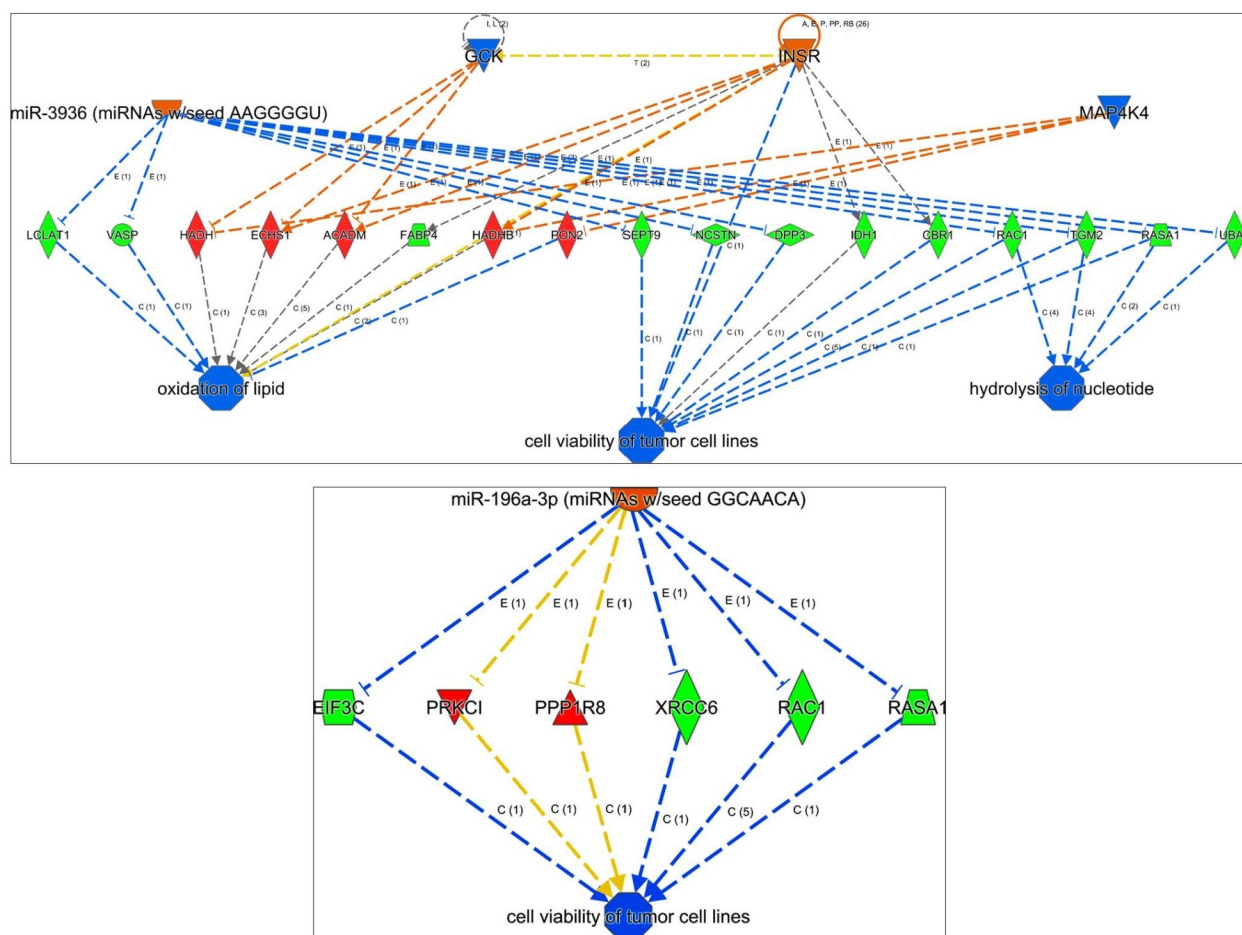


Figura 25. Redes de regulación de efectos predichas tras la comparación de los proteomas de shCT y shAKT3. Significado de los símbolos como en figura 22.

Por lo tanto, los interactomas generados con Ingenuity confirman el papel fundamental de la mitocondria en la adaptación al silenciamiento individual de las isoformas de AKT, y una mayor similitud entre el bloqueo de AKT2 y AKT3 en comparación con AKT1. En el caso de la adaptación a la inhibición de AKT1, sugiere una activación de la vía RAS/RAF/MEK/ERK como ruta de escape, mientras que no es así en AKT2 y AKT3. Por otro lado, las redes de efectos de regulación generadas a partir de las proteínas diferencialmente expresadas tras la adaptación a la inhibición de AKT2 y AKT3 indican una mayor dependencia de la oxidación de ácidos grasos para la obtención de energía, secundaria a la inhibición de GSK e INSR.

RESULTADOS

2.4. Validación de los resultados de proteómica por *Western Blot*

Para confirmar las alteraciones detectadas mediante los estudios de proteómica cuantitativa, se realizaron estudios de inmunodetección de proteínas con anticuerpos específicos en membrana de nitrocelulosa (*Western Blot*). Hay que remarcar que los resultados por *Western Blot* no son totalmente cuantitativos, pero pueden validar las tendencias observadas en dianas específicas seleccionadas a partir de los interactomas reconstruidos. Dado el gran impacto observado en las mitocondrias, se seleccionaron para la validación proteínas relacionadas con la función mitocondrial en las líneas celulares adaptadas al silenciamiento individual de las isoformas de AKT y la línea control. Las proteínas elegidas fueron las siguientes:

- HADHA: *hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional*, cataliza los últimos 3 pasos de la beta-oxidación mitocondrial de ácidos grasos de cadena larga.
- HARS2: *histidyl-tRNA synthetase 2*, proteína mitocondrial que regula la biosíntesis proteica.
- SSBP1: *single stranded DNA binding protein 1*, relacionado con la biogénesis mitocondrial y también con el mantenimiento de la estabilidad del genoma mitocondrial.
- TFB2M: *transcription factor B2 mitochondrial*, necesario para la transcripción del ADN mitocondrial.
- VDAC1: *voltage dependent anion channel 1*, localizado en la membrana mitocondrial, facilita el intercambio de metabolitos e iones a través de la misma y puede regular funciones mitocondriales.

Las tendencias de sobre-expresión en esas proteínas se validaron, con un aumento de la expresión en las líneas modificadas en comparación con la línea control, especialmente marcado en VDAC1 y en HADHA (Figura 26). Notablemente, la sobre-expresión de SSBP1 y HARS2 era especialmente evidente en la línea celular adaptada al silenciamiento de AKT3. Por último, teniendo en cuenta la posición preferente de AKT dentro de la vía PI3K/AKT/mTOR, se evaluaron los niveles de expresión de mTOR (su diana final), detectando un claro aumento en todas las líneas adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT.

RESULTADOS

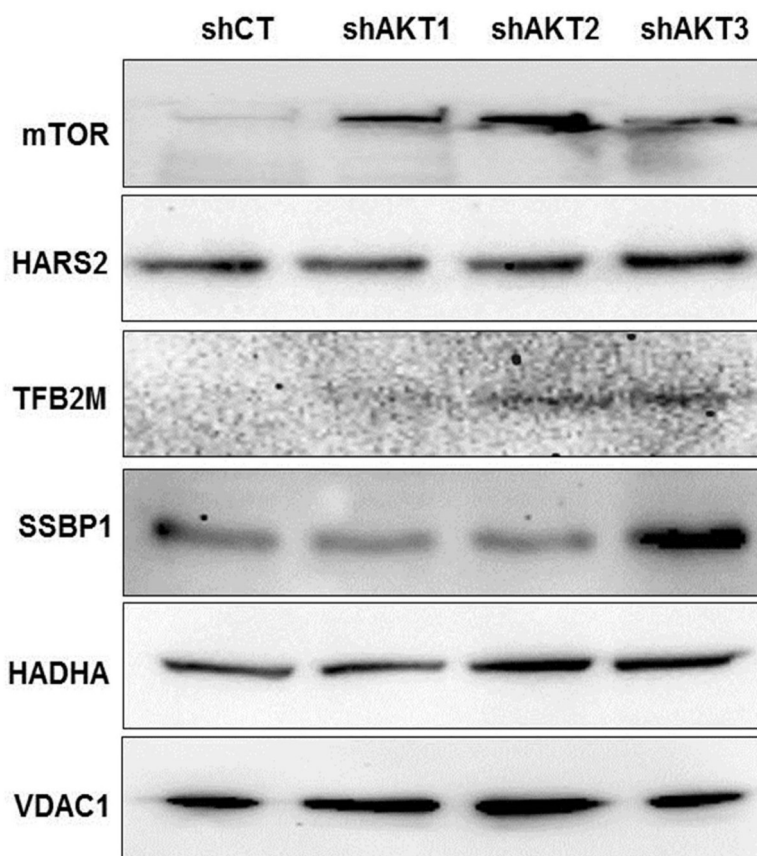


Figura 26. Detección de las proteínas indicadas a la izquierda en extractos de las líneas celulares referenciadas en la parte superior mediante Western Blot.

Los resultados apoyaron el incremento de la función mitocondrial identificado por proteómica cuantitativa como mecanismo de adaptación al silenciamiento mantenido de cualquiera de las isoformas de AKT. Además sugieren un estímulo de la expresión de mTOR como ruta de escape.

2.5. La adaptación al silenciamiento individual de las isoformas de AKT revierte el efecto Warburg

Los datos de proteómica cuantitativa y *Western Blot* indicaban una mayor dependencia de la función mitocondrial y la disminución de la glicolisis en las células adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT, lo que sugiere una reversión del efecto Warburg. Para comprobar funcionalmente si este era el caso, se optó por dos enfoques distintos. Inicialmente se evaluó si el número de mitocondrias estaba aumentado como sugería el incremento en la expresión de proteínas

RESULTADOS

mitocondriales. Para ello se realizó una tinción con MitoTracker Green FM (MTG), cuya intensidad de fluorescencia se ha demostrado como un buen surrogado de la masa mitocondrial (Puleston D *et al*, 2015). La detección directa por citometría de flujo mostró unos resultados inconcluyentes. Por este motivo se determinó la fluorescencia directa en células vivas sin manipular utilizando el lector multi-modal de microscopia y captura de imágenes Cytation 5.

En las imágenes obtenidas se evidenció un claro aumento de la fluorescencia derivada de MTG, indicando un incremento de la masa mitocondrial en las líneas celulares modificadas (Figura 27). La cuantificación de la intensidad de fluorescencia integrada verificó este hallazgo, con diferencias estadísticamente significativas en las líneas modificadas en comparación con la línea control, así como al comparar las líneas adaptadas al silenciamiento de AKT1 y AKT2 entre sí.

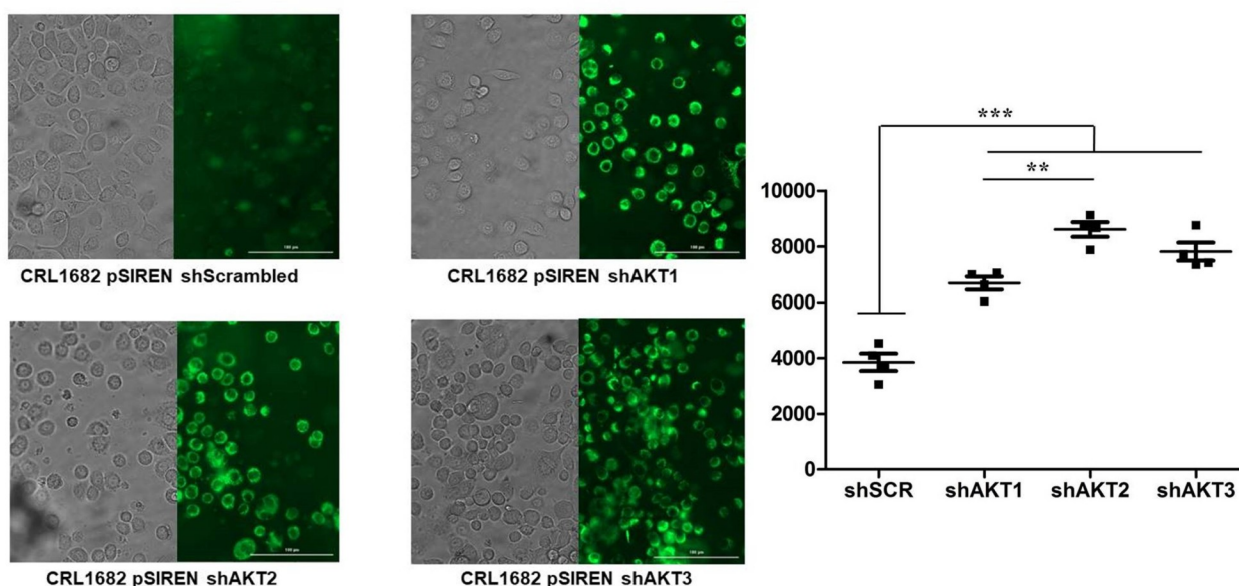


Figura 27. Izquierda, capturas de imagen utilizando microscopia de fluorescencia de líneas celulares de cáncer de páncreas adaptadas al silenciamiento del short hairpin indicado debajo, teñidas con MitoTracker Green FM. Derecha, gráfico de puntos representando la intensidad de fluorescencia integrada para cada línea celular. *, ** y *** representan diferencias muy significativas ($p < 0.001$) y altamente significativas ($p < 0.0001$).

De esta forma se confirmó una expansión del “compartimento mitocondrial”. A continuación, se estudió la dependencia de las líneas celulares adaptadas a la función mitocondrial mediante la cuantificación del consumo de oxígeno (tasa de consumo de oxígeno, u OCR) utilizando la tecnología Agilent SeaHorse XF (Figura 28).

RESULTADOS

La OCR en condiciones basales de la línea adaptada al silenciamiento de AKT1 fue significativamente superior a la del resto de líneas celulares incluyendo la línea control. Lo mismo sucedió con la respiración dependiente de la síntesis de ATP, calculada como la diferencia entre la OCR basal menos la detectada bloqueando la cadena respiratoria mitocondrial con oligomicina. La respiración máxima, que se puede medir tras permitir el paso libre de protones a través de la membrana mitocondrial al añadir FCCP, también fue significativamente superior en la línea adaptada al silenciamiento de AKT1. Por último, también se detectó un leve aumento de la respiración producida por el flujo de protones, es decir independiente de la síntesis de ATP.

Respecto a las líneas adaptadas al silenciamiento de AKT2 y AKT3, se objetivó una leve reducción, algo más acusada en el segundo, de OCR basal y máxima en comparación con la línea control.

Los resultados indicaron que para superar el silenciamiento individual y mantenido de cualquiera de las isoformas de AKT, las células de adenocarcinoma de páncreas humano aumentan la masa mitocondrial. Sin embargo sólo tras la adaptación a la inhibición de AKT1 aumenta la respiración mitocondrial, lo que se podría explicar con que la gran mayoría de las rutas de escape detectadas por proteómica están relacionadas con la mitocondria. Por lo tanto, la dependencia de esta línea celular de esta organela es muy importante, mientras que las células que se adaptaron al silenciamiento de AKT2 y AKT3 adoptaban una mayor diversificación de los mecanismos de escape. Valorando los datos en conjunto, estos apoyan un cambio del metabolismo de las células como mecanismo de adaptación, sustituyendo la glicolisis aeróbica o efecto Warburg habitual en el cáncer de páncreas por la fosforilación oxidativa mitocondrial.

RESULTADOS

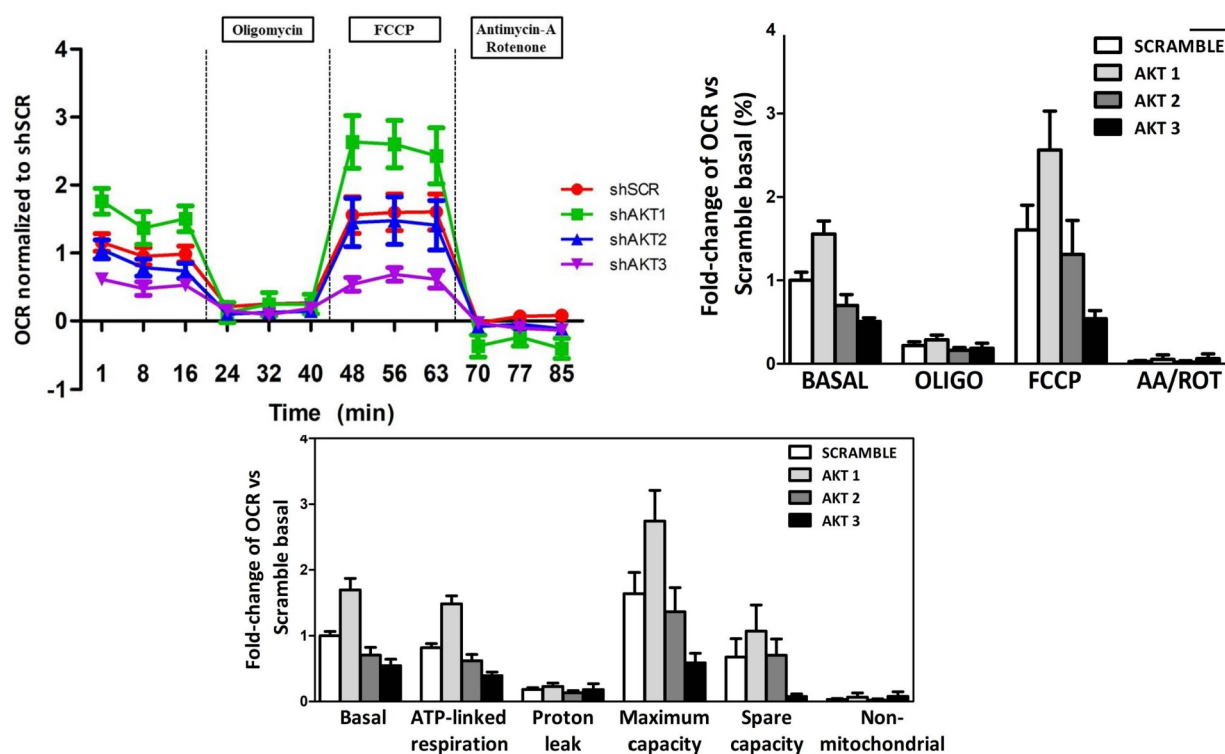


Figura 28. Arriba izquierda, gráfico de líneas representando la medición de las OCR de las líneas celulares en función del tiempo y su respectivo intervalo de confianza, indicando en la parte superior el compuesto añadido al medio. Arriba derecha, gráfico de barras representando la comparativa de los OCR en las diferentes líneas celulares, normalizado respecto a la línea control, tras la adición de los compuestos indicados en la zona inferior. Mediciones realizadas en los minutos 16, 24, 48 y 70. Abajo, gráfico de barras representando las OCR correspondientes a diferentes procesos mitocondriales en las 4 líneas celulares, normalizado respecto a la línea control.

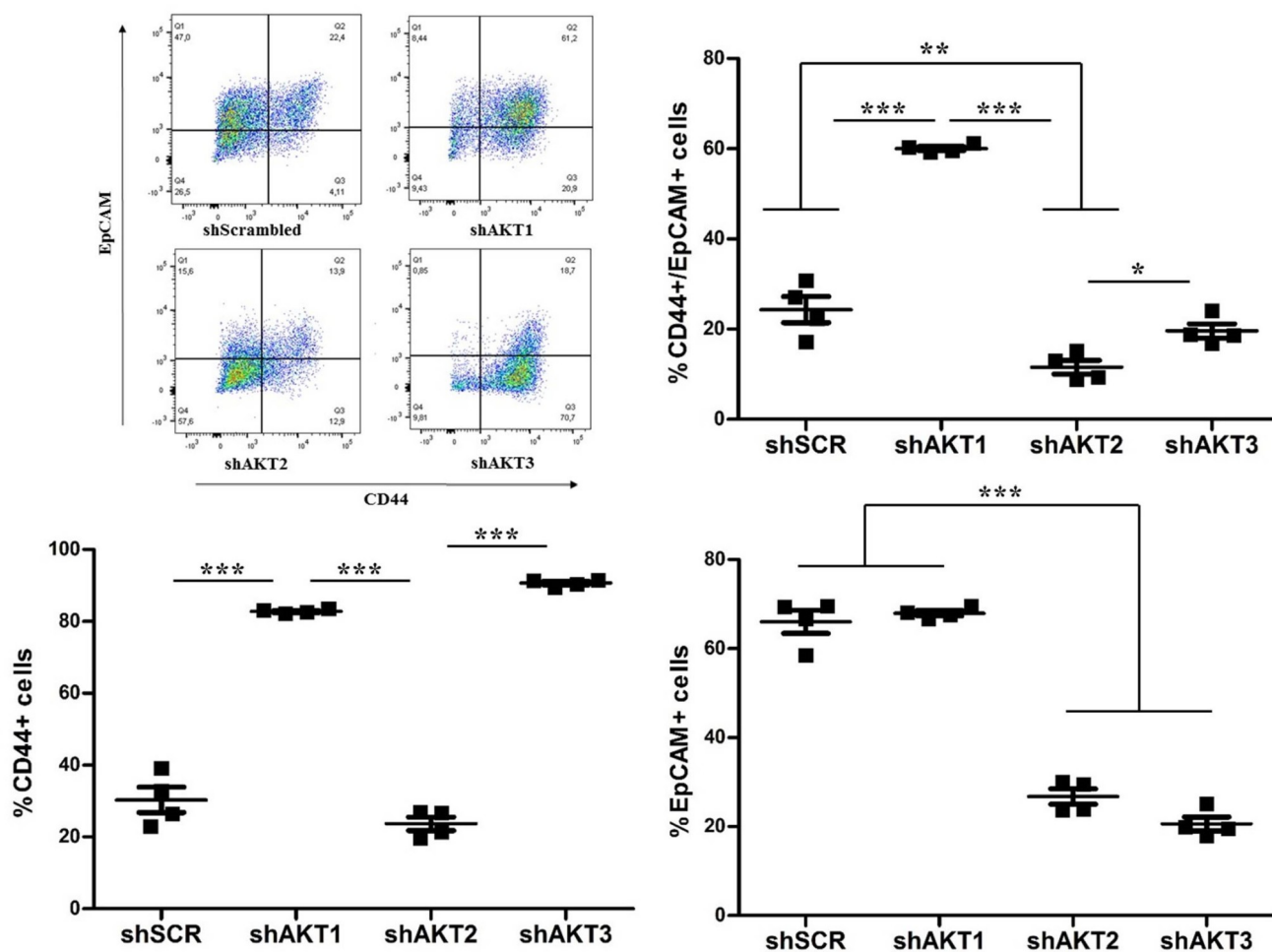
2.6. Las células de adenocarcinoma de páncreas adaptadas al silenciamiento de AKT1 adoptan un fenotipo de células madre cancerosas

Las células madre de adenocarcinoma de páncreas (CMC) en comparación con las más diferenciadas presentan un incremento de la actividad mitocondrial. Estas tienen una gran importancia, dada su frecuente quimiorresistencia y su alto potencial proliferativo, habiendo sido propuestas como principales responsables de la recaída en el cáncer (Easwaran H *et al*, 2014; Gonçalves JM *et al*, 2018; Sinha N *et al*, 2013). Para evaluar si las células que se han adaptado al silenciamiento mantenido de las isoformas de AKT poseen características de célula madre, lo que podría explicar los resultados obtenidos en experimentos anteriores, se estudió por citometría de

RESULTADOS

flujo la co-expresión en superficie de CD44 y EpCAM, marcadores bien establecidos de CMC.

Se detectaron cambios significativos en la expresión de estos marcadores entre la línea control y las líneas modificadas (Figura 29). En las líneas adaptadas a la inhibición de AKT1 y de AKT3 se objetivó un aumento de la expresión de CD44 en superficie celular. La expresión de EpCAM era bastante elevada en la línea control y se mantuvo en las células adaptadas al silenciamiento de AKT1. Sin embargo, la expresión en superficie de este marcador disminuyó en las líneas adaptadas al silenciamiento de AKT2 y de AKT3. Solo en el caso de la adaptación a la inhibición de AKT1 las células respondieron incrementando significativamente los niveles de co-expresión en superficie de CD44 y EpCAM (60.1%, IC95% 58.6 a 61.5; $p < 0.0001$). Estos resultados sugirieron que para superar el silenciamiento estable de al menos AKT1, las células de adenocarcinoma de páncreas metastásico humano adoptan un fenotipo propio de células madre cancerosas.



RESULTADOS

Figura 29. Arriba izquierda, gráficos de citometría de flujo comparando en las líneas de adenocarcinoma de páncreas señaladas debajo la expresión simultánea de los marcadores de células madre cancerosas indicados en los bordes externos. Arriba derecha, comparación del porcentaje de células con expresión simultánea de CD44 y EpCAM en las líneas celulares indicadas. Abajo izquierda, gráfico de puntos comparando el porcentaje de células con expresión de CD44 en las líneas celulares indicadas debajo. Abajo derecha, comparación del porcentaje de células con expresión de EpCAM en las líneas celulares indicadas. *, ** y *** representan diferencias significativas ($p < 0.05$), muy significativas ($p < 0.001$) y altamente significativas ($p < 0.0001$).

2.7. Las células adaptadas al silenciamiento de las isoformas de AKT presentan un aumento de la autofagia

Dado que está descrito de la autofagia basal se encuentra incrementada en las CMCs de páncreas y es fundamental para su supervivencia (Rausch V *et al*, 2012; Zhu H *et al*, 2013), se cuantificó este proceso en las líneas modificadas y se comparó con la línea control. Una mayor autofagia apoyaría que las células adaptadas a la inhibición de AKT1 se han desdiferenciado hacia CMCs. Tras exponer a las células a cloroquina durante 24 horas, se observó un incremento significativo de la expresión de LC3B-II en comparación con la línea control únicamente con la concentración de 100 μM en las líneas adaptadas al silenciamiento de AKT1 y de AKT3, mientras que no se objetivaron diferencias con cloroquina 50 μM o independientemente de la concentración en la línea que expresaban shAKT2 (Figura 30).

RESULTADOS

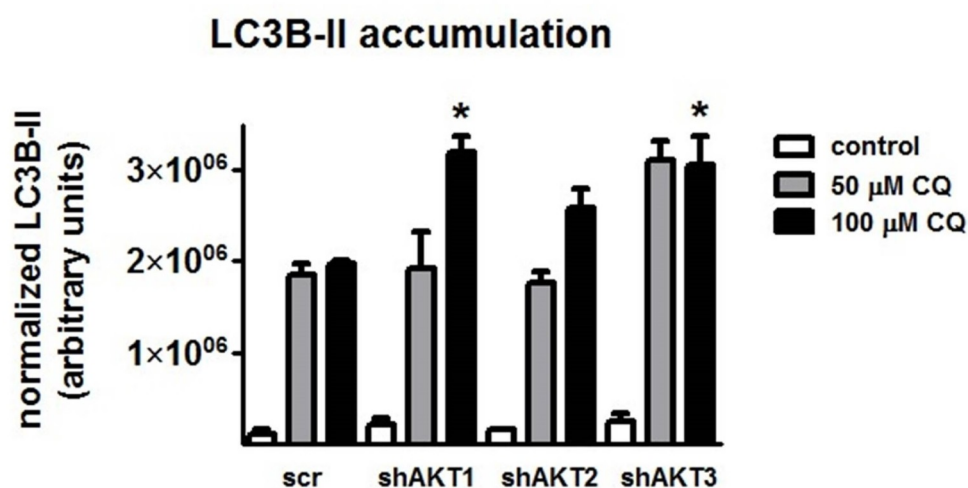
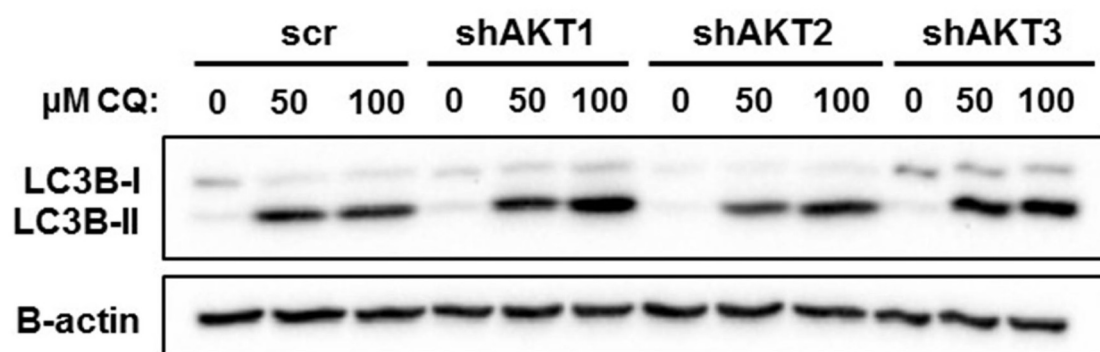


Figura 30. Arriba, *Western Blot* mostrando la expresión de LC3B-I y LC3B-II en las distintas líneas celulares tras la exposición durante 24 horas a la concentración de cloroquina indicada. Abajo, gráfico de barras comparando por ANOVA la cuantificación relativa de LC3B-II para las líneas indicadas tras la exposición a la dosis de cloroquina indicada. * representa diferencias significativas ($p < 0.05$).

Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las células de adenocarcinoma de páncreas adaptadas a la inhibición de AKT1 y AKT3 aumentan la autofagia.

2.8. La activación constitutiva de C-MYC revierte la desdiferenciación de las células de adenocarcinoma de páncreas

El fenotipo metabólico de las células de adenocarcinoma de páncreas depende del equilibrio entre MYC y PCG-1 α , habiéndose demostrado *in vitro* un aumento de la respiración mitocondrial y de la proporción de células CD133⁺ tras la inhibición de MYC por métodos farmacológicos o mediante silenciamiento génico (Sancho P *et al*, 2015).

RESULTADOS

Con la intención de comprobar si esta molécula tiene también un papel fundamental en la desdiferenciación de las células de adenocarcinoma de páncreas tras la adaptación a la inhibición de isoformas de AKT, se cuantificó la expresión de c-MYC por Western Blot, detectándose un descenso únicamente en la línea con silenciamiento de *AKT1* (Figura 31).

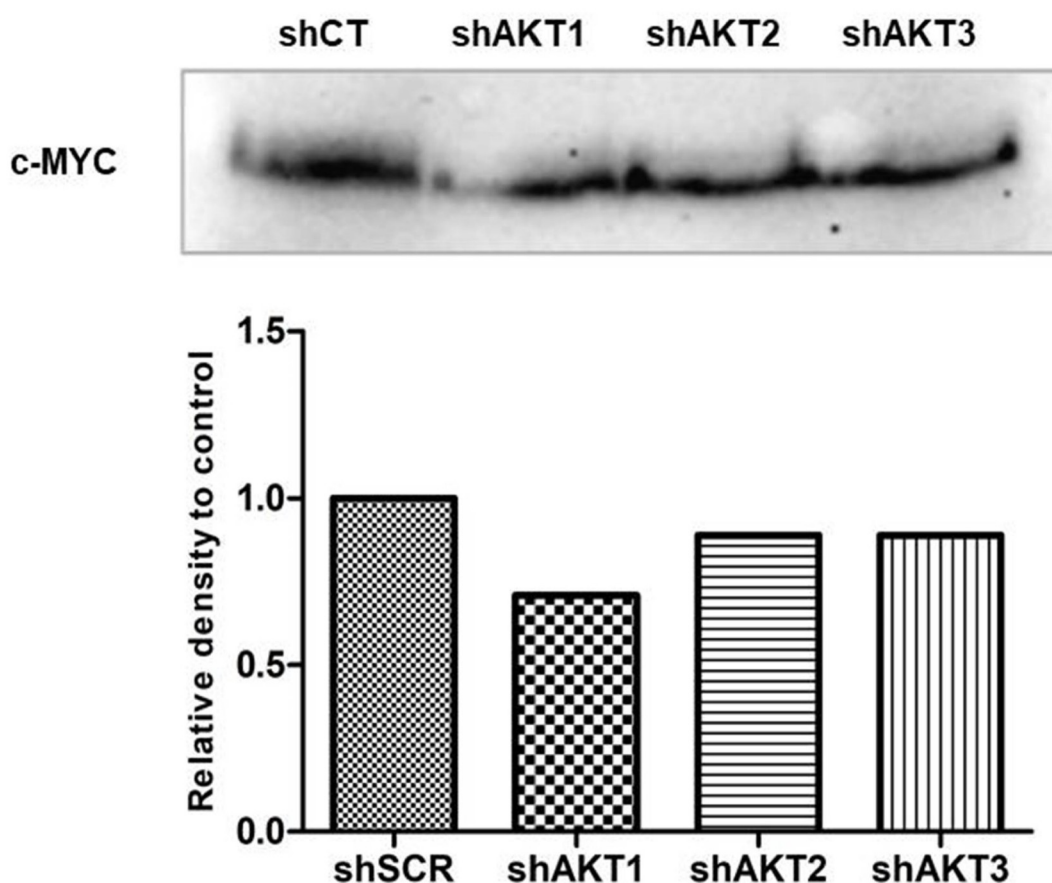


Figura 31. Arriba, detección mediante Western Blot de c-MYC en extractos de las líneas celulares referenciadas en la parte superior. Abajo, gráfico de barras mostrando la cuantificación relativa, utilizando el valor de la línea control como referencia.

A continuación se generó una línea con activación constitutiva de *MYC* (*c-MYC* T58A) mediante transducción con vectores lentivirales y selección con puromicina. A continuación se comparó con una línea control sin transducir la masa mitocondrial utilizando la tinción MitoTracker Green FM, tal y como se ha descrito. Las células con activación constitutiva de *c-MYC* mostraron una disminución significativa de la fluorescencia, además de un cambio en su fenotipo, lo que indica una reducción de la masa mitocondrial (Figura 32). A continuación se evaluó la expresión de

RESULTADOS

marcadores propios de CMCs por citometría de flujo. En la línea con activación constitutiva de *c-MYC* se objetivó una marcada disminución tanto de CD44 como de EpCAM en comparación con el control, viéndose una importante homogeneidad en la expresión de estos marcadores (Figura 33). Estos resultados están de acuerdo con los publicados en el artículo de Sancho P *et al.*

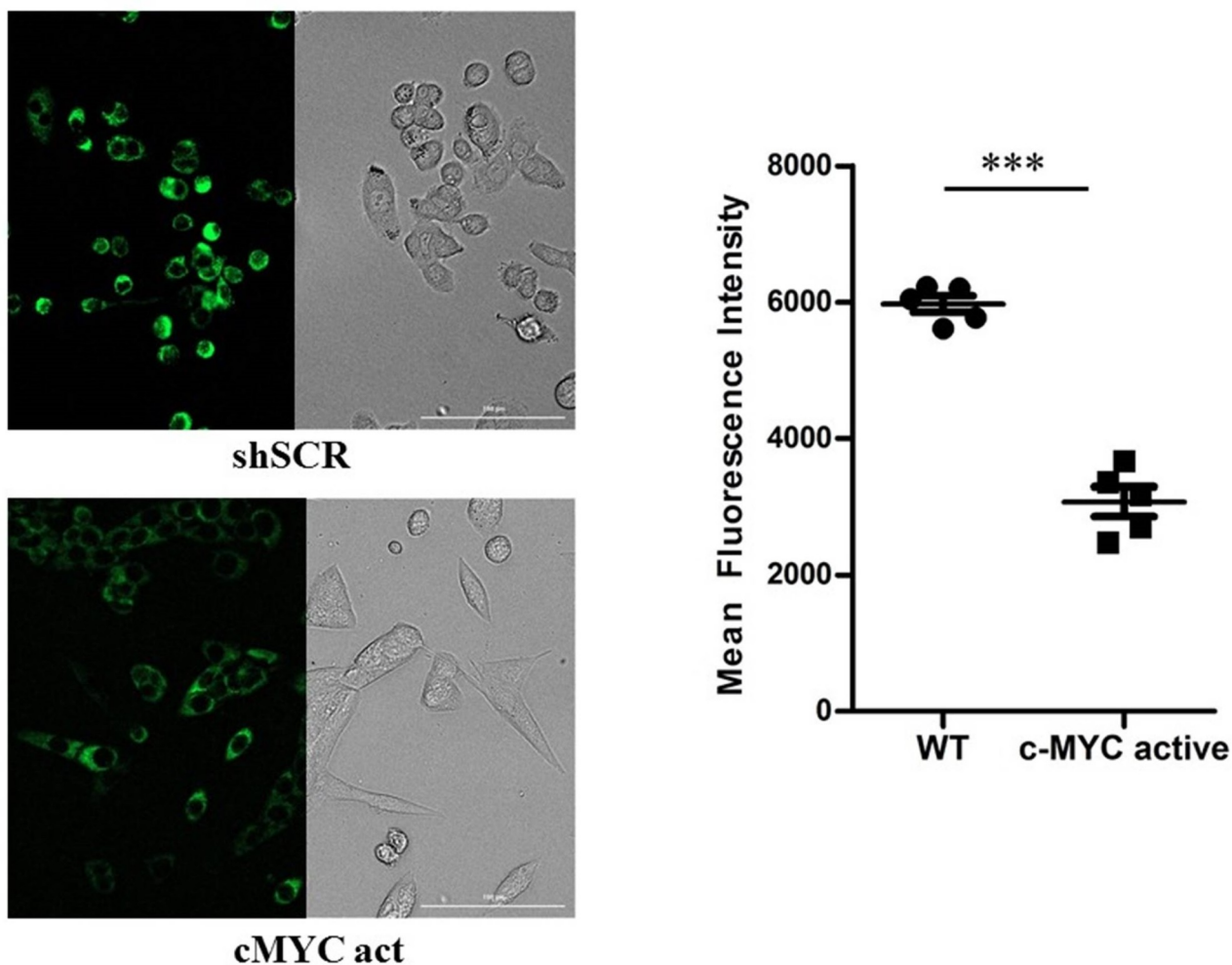


Figura 32. Izquierda, imágenes de microscopía de fluorescencia de líneas celulares de cáncer de páncreas expresando el gen indicado debajo, teñidas con MitoTracker Green FM. Derecha, gráficos representando la intensidad de fluorescencia integrada para cada línea celular. *** representa diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$).

RESULTADOS

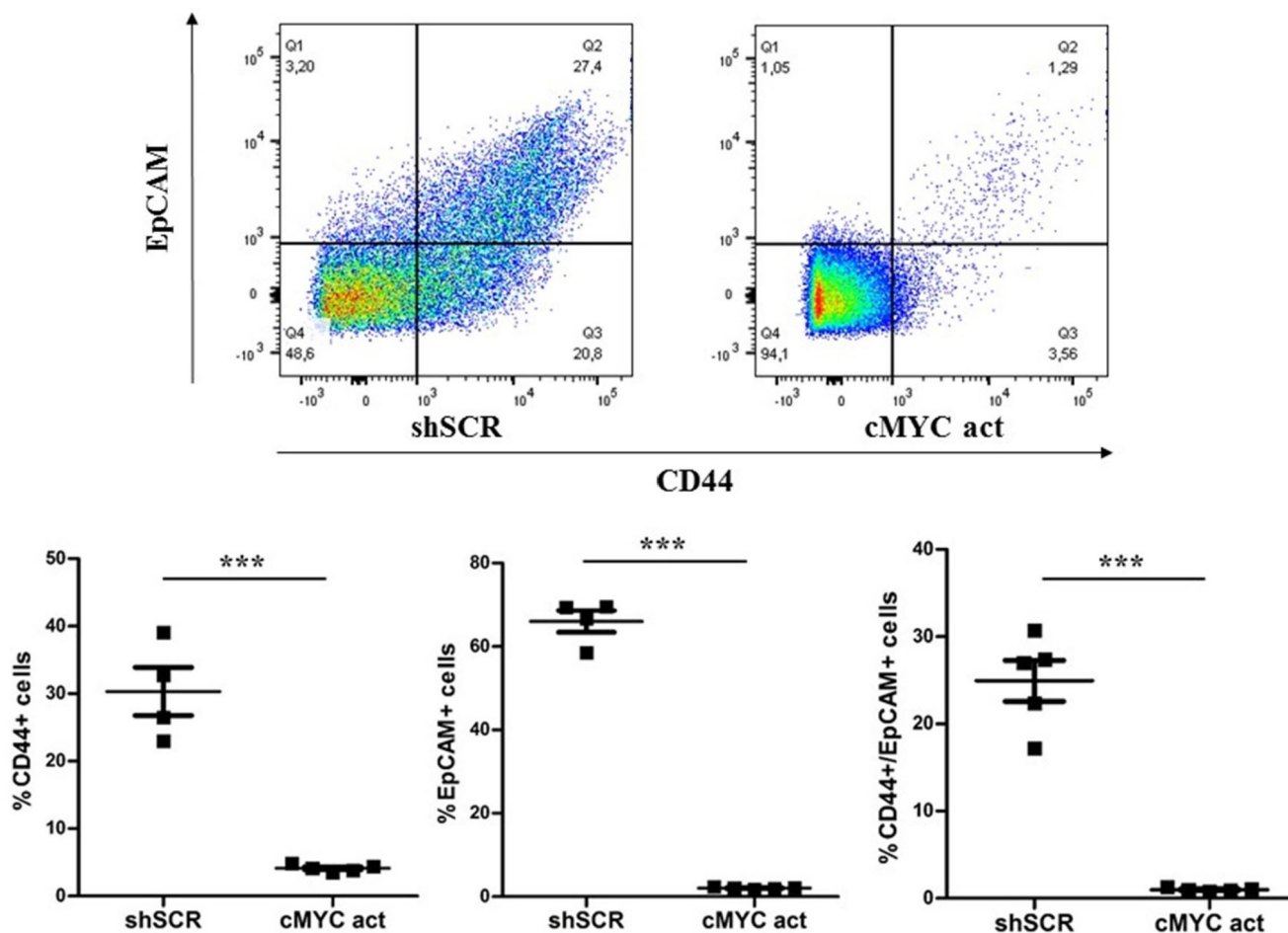


Figura 33. Arriba, gráficos de citometría de flujo comparando la expresión simultánea de los marcadores de células madre cancerosas en las líneas de adenocarcinoma de páncreas indicadas. Abajo izquierda, gráfico de puntos comparando el porcentaje de células con expresión de CD44 en las líneas celulares indicadas debajo. Abajo centro, comparación del porcentaje de células con expresión de EpCAM en las líneas celulares indicadas. Abajo derecha, comparación del porcentaje de células con expresión simultánea de CD44 y EpCAM en las líneas celulares indicadas. *** representa diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$).

Estos hallazgos indican un papel fundamental de c-MYC en el metabolismo celular en adenocarcinoma de páncreas, así como en la dediferenciación hacia CMCs. Por otro lado, apoya fuertemente la plasticidad metabólica de las células y su capacidad de alterar su estado de diferenciación en función de los estímulos recibidos.

RESULTADOS

3. EVALUACIÓN DE LA SINERGIA ENTRE EL SILENCIAMIENTO DE LAS ISOFORMAS DE AKT Y TERAPIAS DIRIGIDAS FRENTE A LA MITOCONDRIA

3.1. Sensibilidad diferencial a terapias dirigidas frente a la mitocondria en las líneas celulares modificadas

Dado el aumento de expresión de genes mitocondriales detectado en las células de adenocarcinoma de páncreas adaptadas, y su mayor dependencia de la función de la mitocondria, se estudió si esto se asociaba con una mayor sensibilidad a terapias dirigidas frente a esta organela. Para ello se evaluó la concentración inhibitoria 50 (IC50) de metformina sobre la proliferación a tiempo real mediante RTCA de las líneas celulares (Figura 34A). La metformina, entre otras cosas inhibe la fosforilación oxidativa y es particularmente eficaz contra las CSC de páncreas humano (Sancho P *et al*, 2015). La IC50 para metformina fue significativamente inferior en cualquiera de las 3 líneas modificadas en comparación con la línea control.

No obstante, la metformina también bloquea la vía PI3K/AKT/mTOR mediante la potenciación de AMPK, un efecto a tener en cuenta dado que la expresión de mTOR estaba incrementada en las líneas adaptadas al silenciamiento de *AKT*. Por ello, se repitió el experimento con tigeciclina, una tetraciclina que inhibe la traducción mitocondrial (Figura 34B). En este caso sólo se objetivó una disminución de la IC50 en la línea adaptada al silenciamiento de *AKT1*, lo que se podría explicar por su mayor dependencia de las funciones mitocondriales y en sus características de célula madre cancerosa.

Los datos indicaron que la alta dependencia del metabolismo mitocondrial en las células adaptadas al silenciamiento de *AKT1* incrementa la sensibilidad de las células de adenocarcinoma pancreático frente a terapias que bloquean la función de la mitocondria.

RESULTADOS

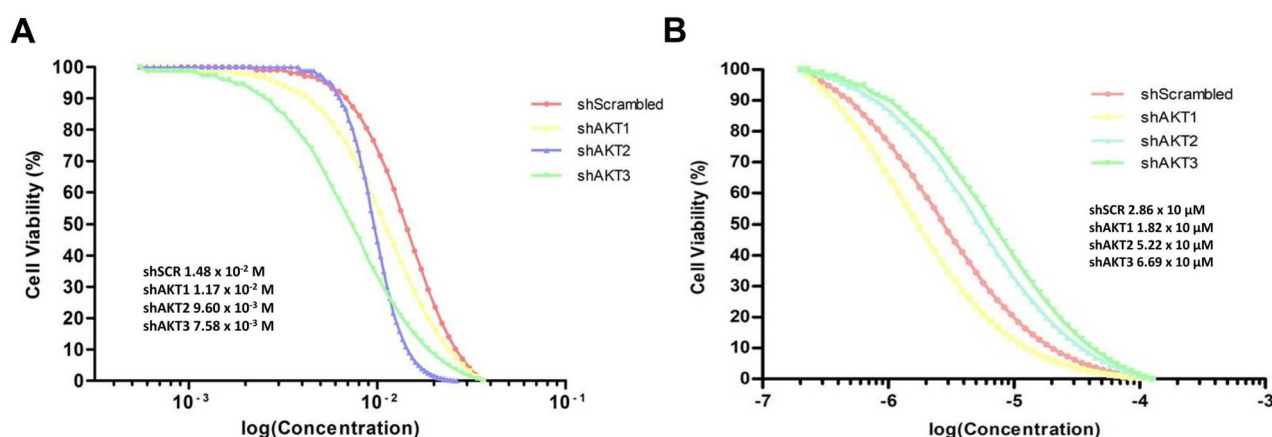


Figura 34. A: Curvas de IC50 para metformina en función de la concentración del compuesto. Cada línea celular está representada por el color indicado en la leyenda. El texto resume la IC50 de cada línea celular. B: Curvas de IC50 para tigeciclina en función de la concentración del compuesto. Cada línea celular está representada por el color indicado en la leyenda. El texto resume la IC50 de cada línea celular.

3.2. Efectos de la inhibición genética de genes mitocondriales después de la adaptación al silenciamiento de AKT1

Los datos sugerían que las células se habían hecho resistentes a la inhibición mantenida de *AKT1* por una alta dependencia de la función mitocondrial, y que las rutas sobre-expresadas en comparación con la línea control estaban casi de forma exclusiva relacionadas con la mitocondria. Para confirmar la dependencia de las líneas adaptadas a las funciones de las mitocondrias, se silenció la expresión de proteínas mitocondriales seleccionadas en base a su posición estratégica dentro de los interactomas. En concreto, se seleccionaron los siguientes:

- HARS2: *histidyl-tRNA synthetase 2*, proteína mitocondrial que regula la biosíntesis proteica.
- SSBP1: *single stranded DNA binding protein 1*, relacionado con la biogénesis mitocondrial y también con el mantenimiento de la estabilidad del genoma mitocondrial.
- TFB2M: *transcription factor B2 mitochondrial*, necesario para la transcripción del ADN mitocondrial.

Se decidió utilizar células AsPC1 adaptadas al silenciamiento de *AKT1*, dado que mostraban una alta capacidad proliferativa, un fenotipo de CSC y sensibilidad frente a metformina. Estas células se

RESULTADOS

transdujeron con un lentivector co-expresando ARNs interferentes validados (diseñados por Sigma-Aldrich) frente a los genes indicados junto con resistencia a blasticidina (Figura 35). Como control, se transdujeron células AsPC1-shAKT1 con lentivectores expresando el ARN interferente control.

Después de la transducción y selección con blasticidina las células volvieron a un estado quiescente, de crecimiento muy lento. Fue necesario mantener el cultivo durante un mes para conseguir suficientes células para continuar con los estudios. El silenciamiento específico de la expresión de las proteínas de interés se demostró nuevamente por Western Blot (Figura 35).

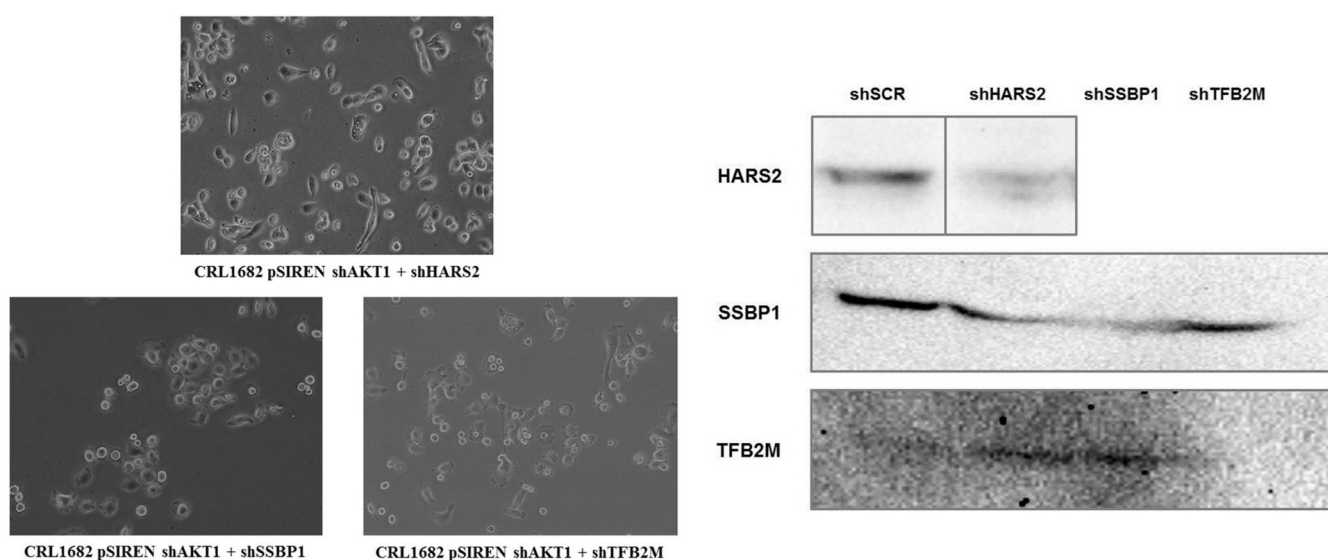


Figura 35. Izquierda, imágenes de microscopía óptica de las células doblemente silenciadas. Derecha, inmunoblot frente a las proteínas indicadas a la izquierda en las líneas celulares que expresan el short hairpin indicado en la parte superior.

3.2.1. El doble silenciamiento de AKT1 y TFB2M aumenta apoptosis, disminuye proliferación y limita el crecimiento celular

Se evaluaron las capacidades proliferativas y las tasas de apoptosis espontánea en las líneas celulares doblemente modificadas tal y como se había realizado con las líneas adaptadas al silenciamiento de las isoformas de *AKT*.

Solo el silenciamiento de *TFB2M* en las células adaptadas a la inhibición de *AKT1* tuvo un impacto significativo, con una disminución de la proliferación (9.38% vs 43,25%, $p < 0.0001$) y un aumento

RESULTADOS

de la apoptosis (9.49% vs 5.72%, $p < 0.0001$) en comparación con el control (Figura 36). El silenciamiento de *HARS2* también indujo un descenso de la proliferación, aunque menor acentuado. Estos datos sugirieron fuertemente que la proteína TFB2M es una de las dianas mitocondriales esenciales para la adaptación a la inhibición de *AKT1*.

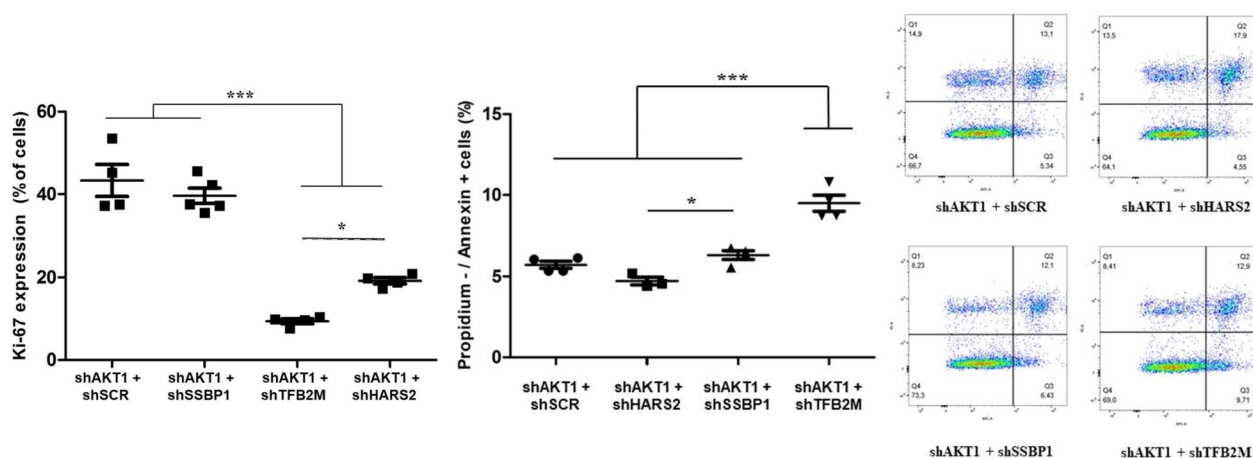


Figura 36. Izquierda, porcentaje de células que expresan Ki-67 en la línea celular indicada, medido por citometría de flujo. Centro, porcentaje de células con expresión Anexina V + / Yoduro de propidio - en la línea celular indicada, medido por citometría de flujo. Derecha, ejemplos representativos de cada línea celular de los gráficos de citometría de flujo en la tinción de Anexina/Propidio. * y *** representan diferencias significativas ($p < 0.05$) y altamente significativas ($p < 0.001$).

RESULTADOS

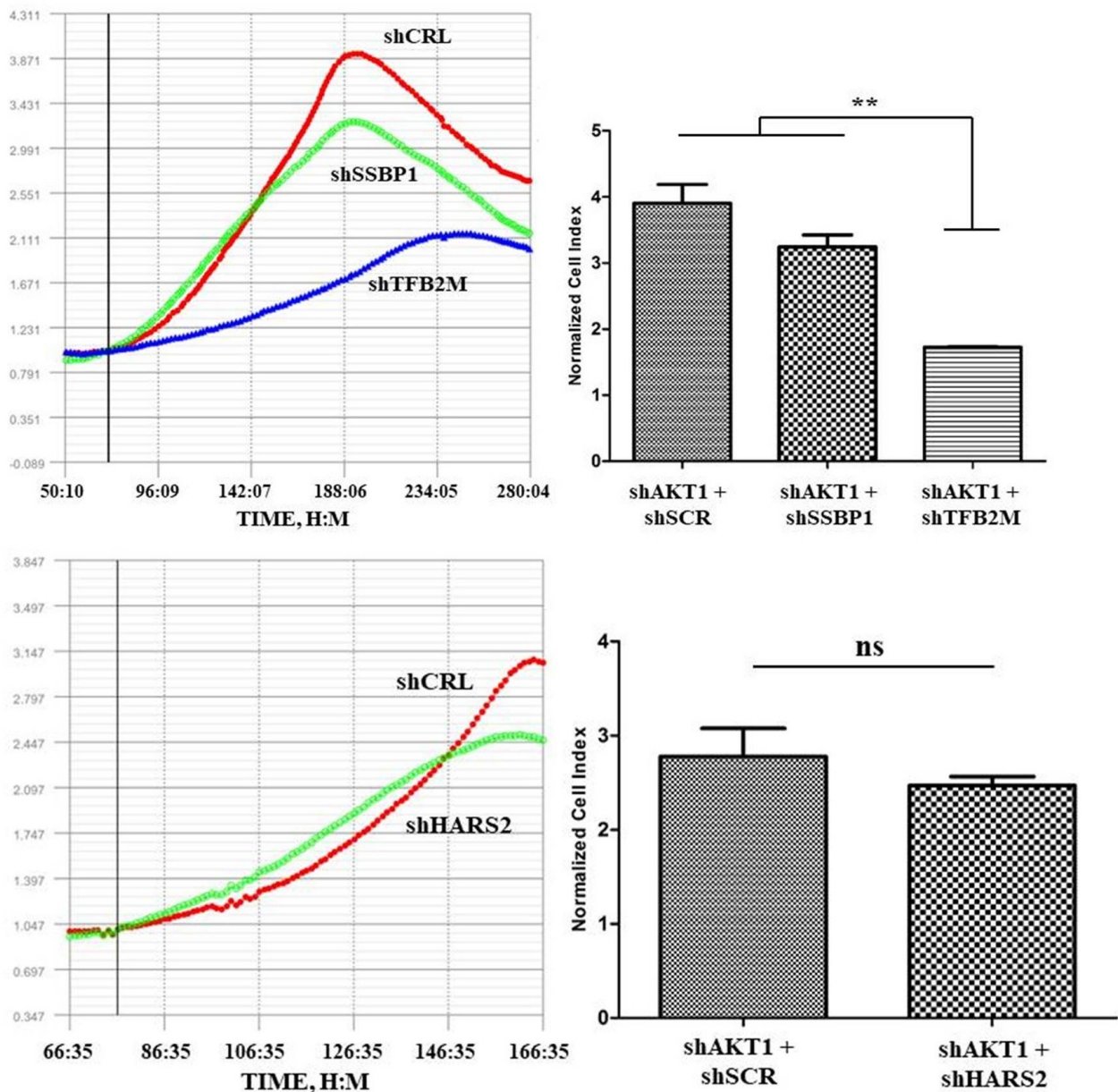


Figura 37. Arriba; izquierda, gráfico de RTCA representando el crecimiento celular en las líneas que expresan shAKT1 + shScrambled, shAKT1 + shSSBP1 y shAKT1 + shTFB2M medido por Índice Celular Normalizado (Normalized Cell Index, NCI) en función del tiempo; derecha, gráfico de barras representando la comparativa con la línea celular indicada debajo. Abajo; izquierda, gráfico de RTCA representando el crecimiento celular en las líneas que expresan shAKT1 + shScrambled y shAKT1 + shHARS2 medido por Índice Celular Normalizado (Normalized Cell Index, NCI) en función del tiempo; derecha, gráfico de barras representando la comparativa con la línea celular indicada debajo. ** representa diferencias muy significativas ($p < 0.001$).

RESULTADOS

3.2.2. El doble silenciamiento de AKT1 y TFB2M, pero no el de HARS2 o el de SSBP1, disminuye la masa mitocondrial

Los resultados sugerían que el silenciamiento de *TFB2M* interfería con la adaptación a la inhibición de AKT1, posiblemente afectando al compartimento mitocondrial. Para comprobar si este era el caso, se analizó la masa mitocondrial en las líneas celulares con MTG. Como se esperaba, solo el silenciamiento de *TFB2M* en las células adaptadas disminuyó la masa mitocondrial, pero no el silenciamiento de *SSPBI* o de *HARS2* (Figura 38). Por lo tanto, la inhibición de proteínas mitocondriales como TFB2M que afectan al incremento de la masa mitocondrial disminuye la proliferación, aumenta la apoptosis e induce un arresto del crecimiento celular en las células que se habían adaptado al silenciamiento de *AKT1*. Estos resultados indicarían una posible sinergia entre el bloqueo de AKT1 y la inhibición de la función mitocondrial mediante el silenciamiento de *TFB2M*. Además, la disminución de la masa mitocondrial observada en esta línea combinada apoya la sensibilidad de las células a la disrupción de la función de la mitocondria.

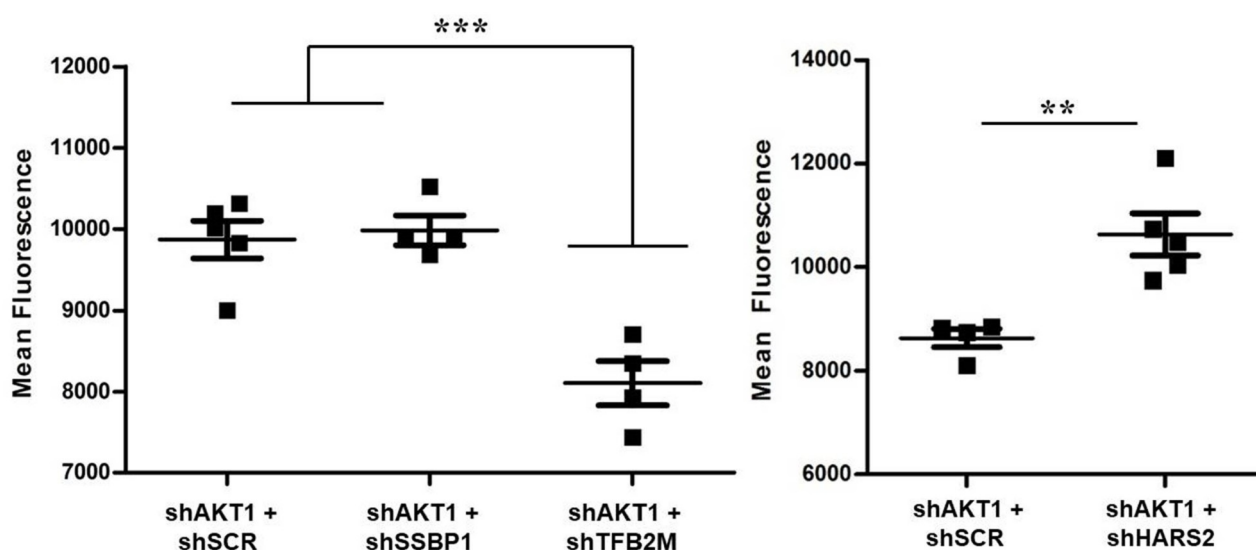


Figura 38. Izquierda, intensidad de fluorescencia integrada media de las líneas celulares indicadas en la parte inferior. Derecha, intensidad de fluorescencia integrada media de las líneas celulares indicadas en la parte inferior. ** y *** representan diferencias muy significativas ($p < 0.001$) y altamente significativas ($p < 0.0001$).

4. ESTUDIOS TERAPÉUTICOS EN MODELOS MURINOS DE ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

Para dar validez a los resultados obtenidos *in vitro*, e incluso más adelante plantear su aplicación en investigación clínica, se estudió en un modelo *in vivo* de adenocarcinoma de páncreas de ratón los efectos que tiene la inhibición química de AKT en combinación con tratamientos que afectan a la mitocondria.

4.1. La metformina ejerce un efecto sinérgico a la inhibición bioquímica de AKT en un modelo de ratón de adenocarcinoma de páncreas murino

Los resultados sugerían que una terapia combinada de inhibición de AKT (pan-inhibición) y de interferencia con la función mitocondrial podría resultar más efectiva que las monoterapias. Para ello, se estudiaron los efectos de la inyección intraperitoneal del inhibidor X de AKT, de metformina o de su combinación en un modelo transplantable de adenocarcinoma de páncreas murino Panc02 en ratones C57BL/6. Los grupos de ratones se establecieron inoculándose 1 millón de células Panc02 por ratón subcutáneamente. Una vez que los tumores fueron palpables, se comenzó con los regímenes de tratamiento dos veces por semana. Para mejorar la sensibilidad del experimento, se utilizaron dosis subóptimas de inhibidor de AKT y de metformina. Aunque se observaron algunos efectos sobre el crecimiento de los tumores en las monoterapias, solo la combinación de ambos tratamientos consiguió un retraso altamente significativo del crecimiento tumoral, y de la supervivencia ($p < 0.0001$) (Figuras 39, 40 y 41).

RESULTADOS

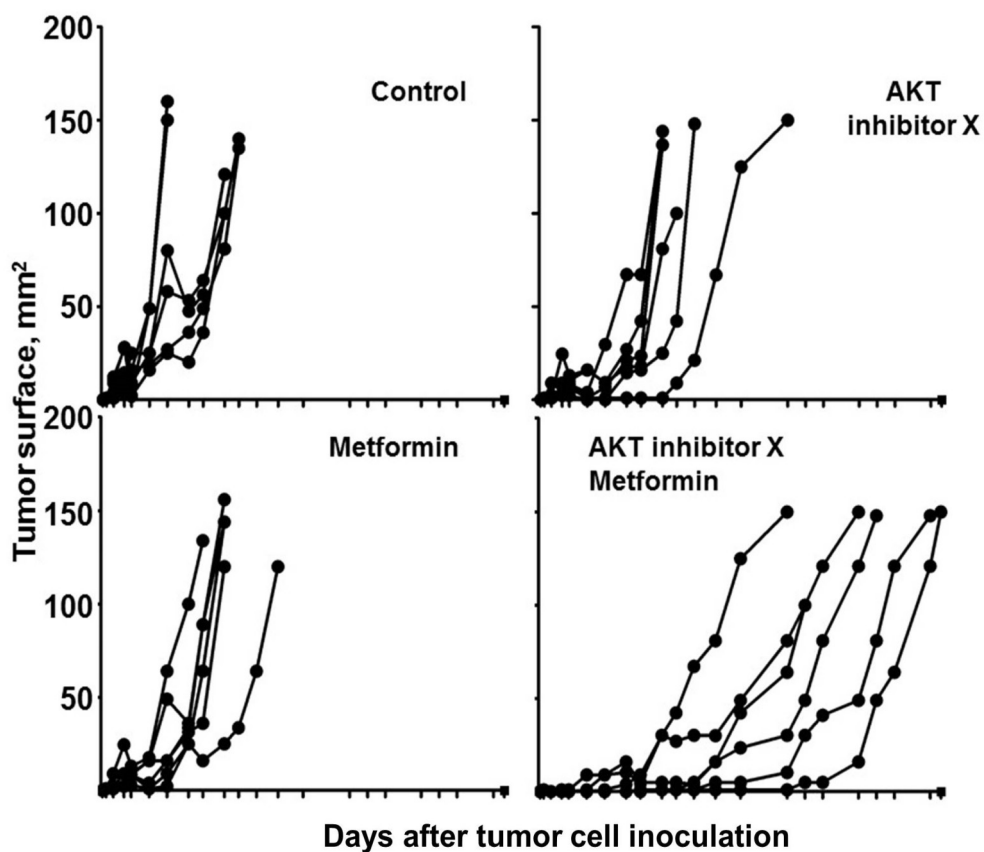
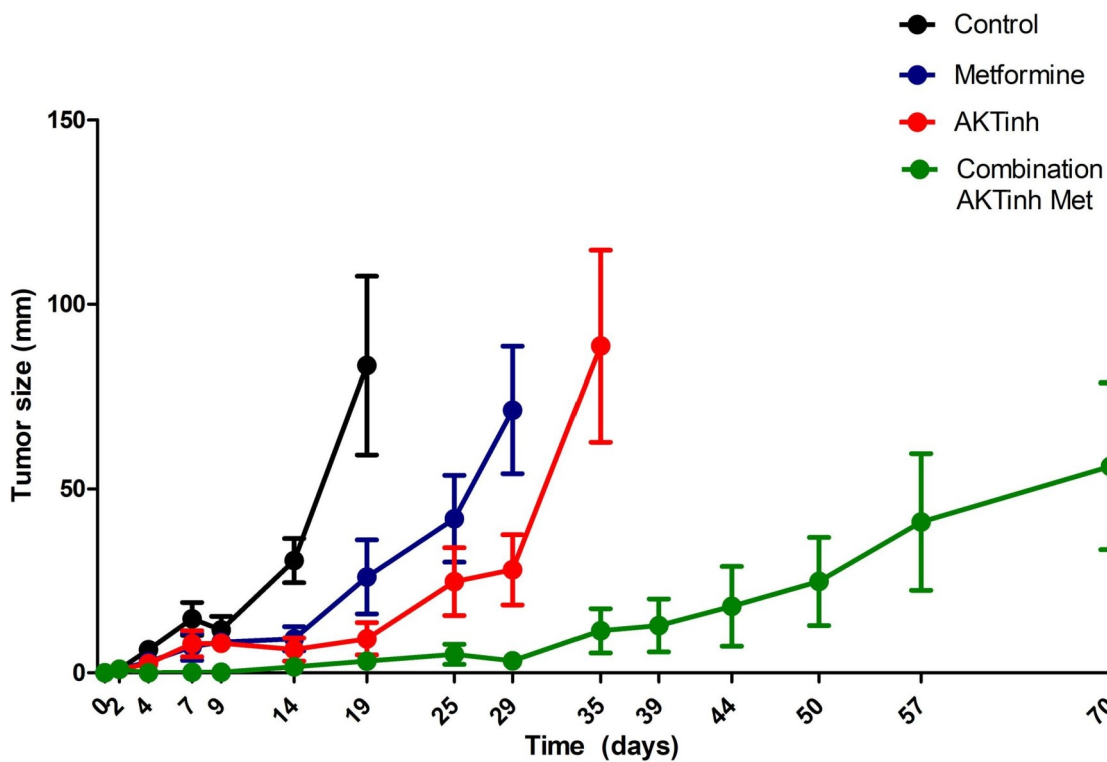


Figura 39. Crecimiento tumoral en función del tiempo en ratones (n=6) inoculados con la línea Panc02, habiendo recibido los tratamientos indicados.



RESULTADOS

Figura 40. Media del tamaño tumoral en función del tiempo en los ratones inoculados con la línea Panc02, sin recibir tratamiento, tratados con metformina, con AKT inhibitor X o con la combinación de ambos.

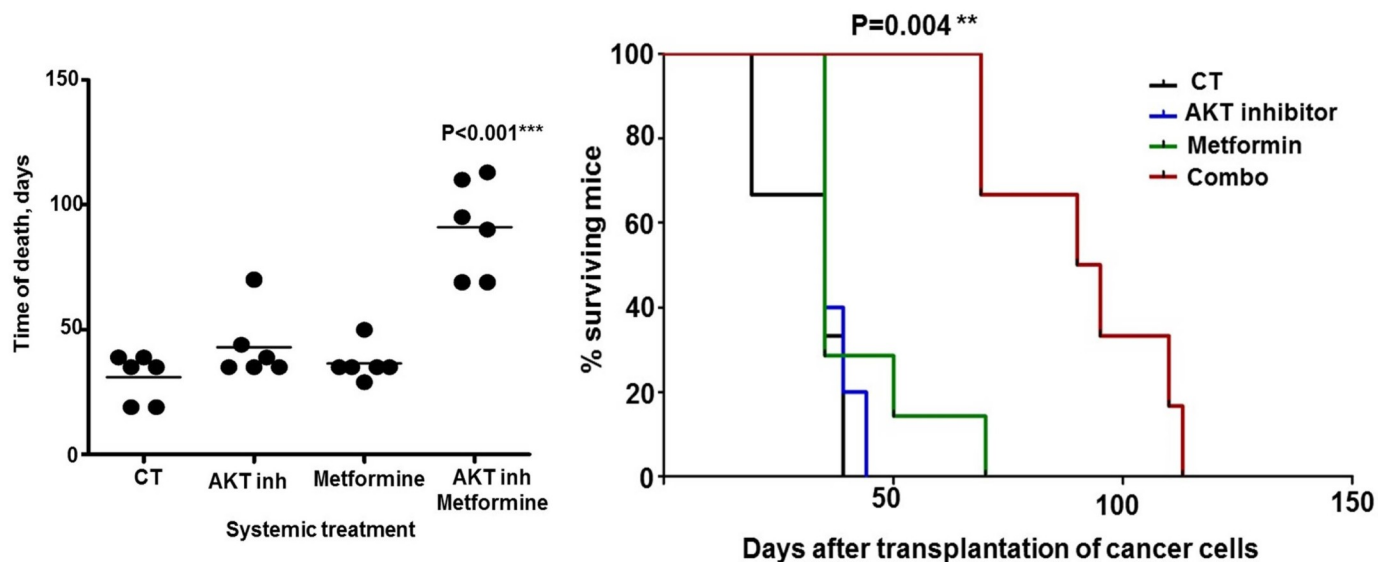


Figura 41. Izquierda, tiempo transcurrido hasta la muerte en los ratones, agrupados por el tratamiento recibido. Las comparaciones se realizaron con ANOVA de una criterio seguido del test de Tukey para comparaciones pareadas. Derecha, gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier representando la supervivencia de los ratones en función del tratamiento recibido. ** y *** representan diferencias muy significativas ($p < 0.001$) y altamente significativas ($p < 0.0001$).

Considerando estos datos se concluyó que tanto el bloqueo de la función mitocondrial como la inhibición de *AKT* son activas en el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas en un modelo *in vivo* murino, pero que la combinación de ambas ejerce un efecto sinérgico.

4.2. La metformina controla de forma eficaz el crecimiento de tumores procedentes de células de adenocarcinoma de páncreas murino adaptadas a la inhibición de *AKT*.

En el experimento anterior, el tratamiento combinado de metformina e inhibidor de *AKT* podría resultar más eficaz debido a una mayor citotoxicidad “inespecífica” combinada, o por inhibición de la dediferenciación hacia CSCs. Para poder resolverlo, se estudió la eficacia de la monoterapia con metformina sobre tumores procedentes de células Panc02 adaptadas a la inhibición de *AKT*, y

RESULTADOS

teniendo en cuenta que se ha descrito que la metformina actúa específicamente sobre las CSCs de cáncer de páncreas (Sancho P *et al*, 2015).

4.2.1. Adaptación de las células Panc02 a la inhibición sostenida de AKT

Para comprobar que la línea de adenocarcinoma de páncreas murino tenía un comportamiento comparable a las correspondientes humanas empleadas en los experimentos anteriores se estudiaron los cambios que se producían en cuanto a fenotipo, crecimiento y masa mitocondrial al someterlas a inhibición farmacológica sostenida de AKT.

Tras mantener a una línea celular en medio de cultivo durante 30 días con una concentración creciente de inhibidor X de AKT hasta llegar a niveles tóxicos, se permitió su crecimiento en medio normal. Por microscopía óptica se detectó un cambio de fenotipo claro en comparación con las células no tratadas (Figura 42A). Se midió también la velocidad de crecimiento por RTCA, comprobándose como esta se encontraba disminuida en comparación con la línea control, alcanzando además una concentración celular máxima significativamente inferior (IC normalizado en punto máximo 3.46 vs 4.33; $p=0.0003$) (Figura 42B).

RESULTADOS

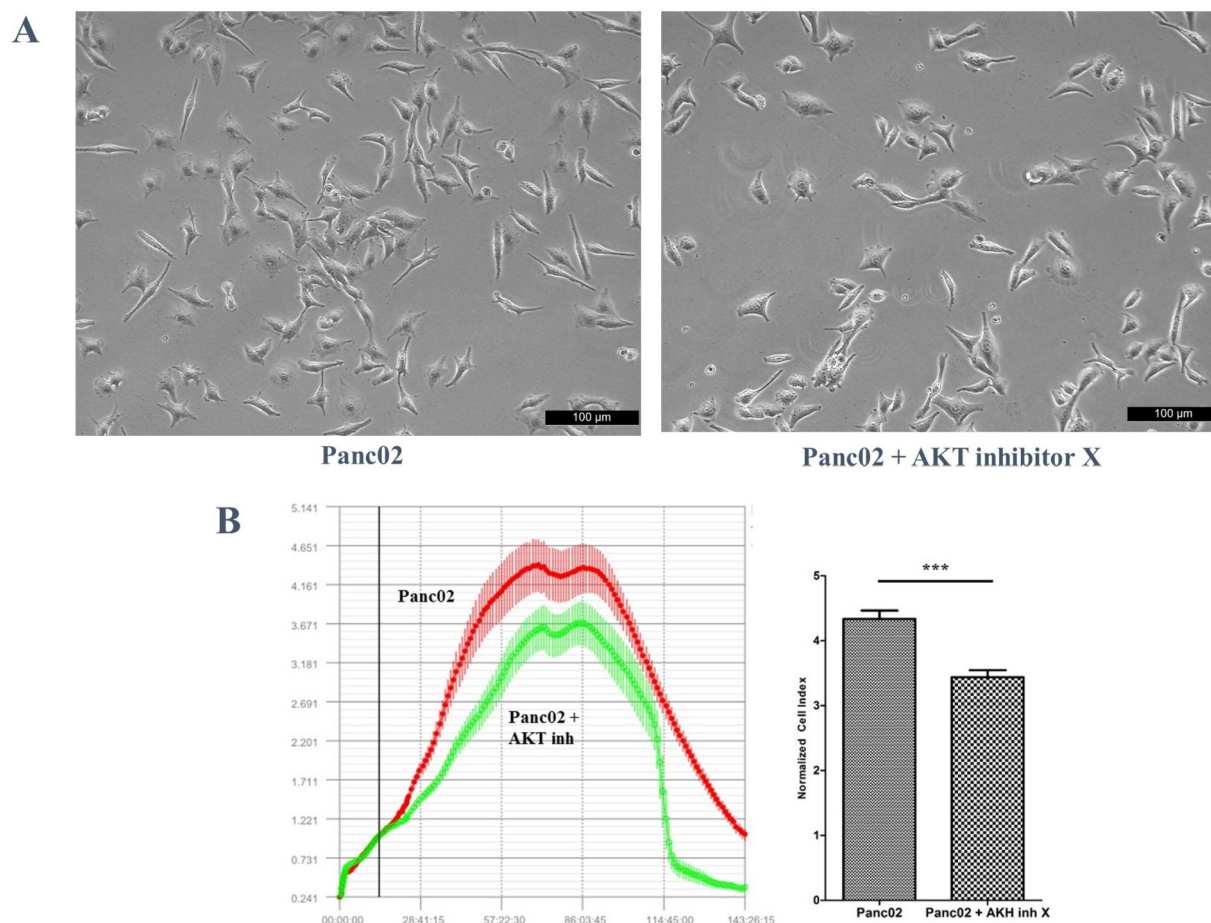


Figura 42. A: Izquierda, imagen de microscopía óptica de la línea celular Panc02. Derecha, imagen de microscopía óptica de la línea celular Panc02 adaptada a la inhibición química sostenida de AKT. B: Izquierda, gráfico de RTCA representando el crecimiento celular de la línea de adenocarcinoma de páncreas murino Panc02, y de esta misma línea tras su adaptación a la inhibición química mantenida de AKT. Derecha, gráfico de barras que representa el NCI de ambas línea celulares en el momento en que una de ellas llega al máximo. *** representa una diferencia altamente significativas ($p < 0.0001$).

A continuación se estimaron los cambios en la masa mitocondrial mediante una tinción con MitoTracker Green FM y medición de fluorescencia con Cytation 5 (Figura 39). En comparación con la línea control, se detectó un aumento muy significativo en intensidad de fluorescencia media en las células adaptadas a la inhibición química de AKT, viéndose además una captación citoplasmática de contraste específica.

RESULTADOS

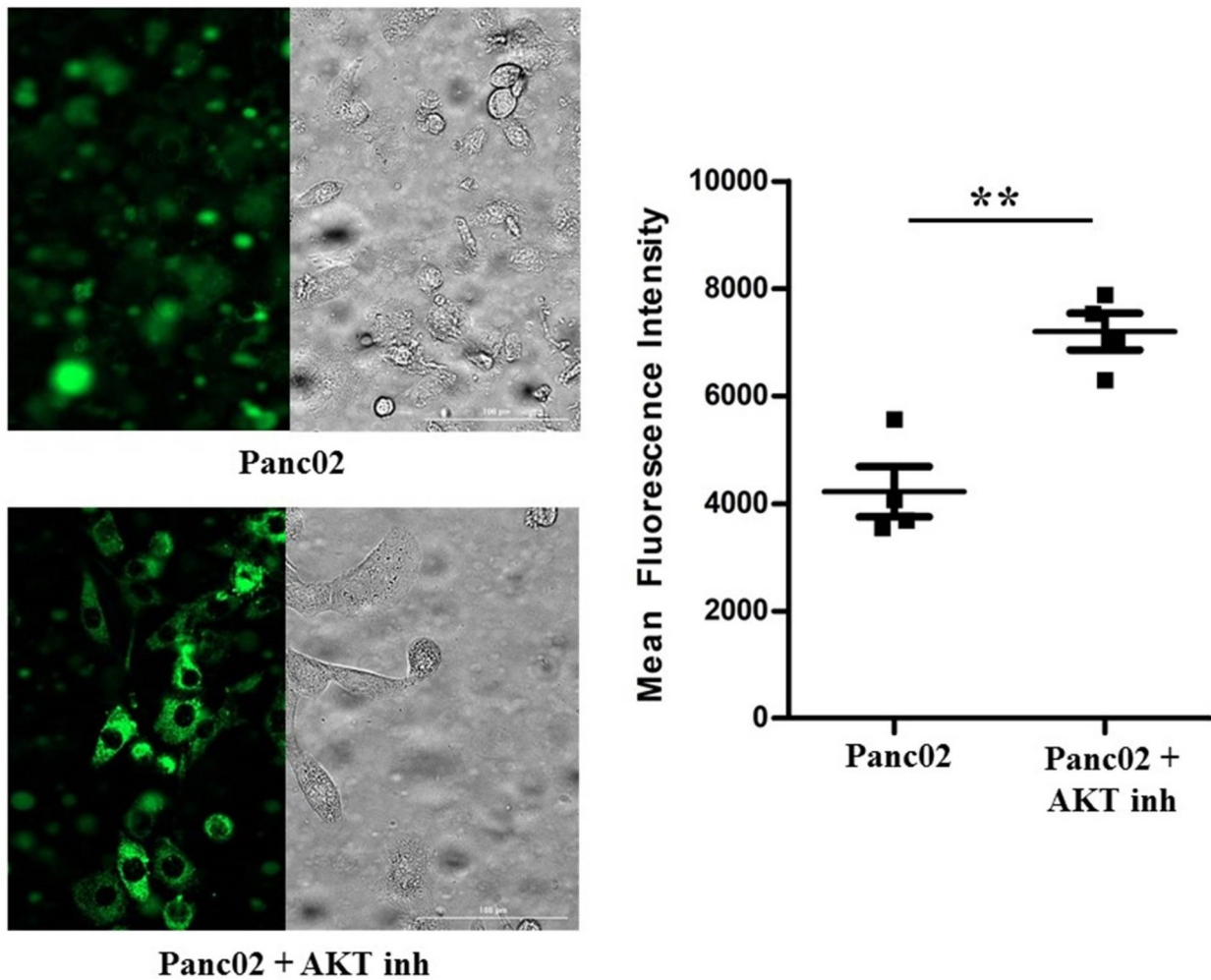


Figura 43. Izquierda, imágenes de microscopia de fluorescencia de las líneas celulares de cáncer de páncreas murino indicadas, teñidas con MitoTracker Green FM. Derecha, gráfico de puntos mostrando la fluorescencia media integrada de dichas líneas. ** representan diferencias muy significativas ($p < 0.001$).

De esta manera, se confirmó que la inhibición química de AKT disminuye la velocidad de crecimiento de las células de adenocarcinoma de páncreas murino Panc02. Además, el aumento de la masa mitocondrial detectado en las células sometidas a una inhibición mantenida indica un mecanismo de adaptación comparable al de las células de origen humano AsPC1.

RESULTADOS

4.2.2. Efectos terapéuticos de la metformina sobre los tumores procedentes de las células adaptadas a la inhibición de AKT

A continuación se evaluó la eficacia de la metformina como tratamiento en ratones inoculados con células de adenocarcinoma de páncreas murino adaptadas a la inhibición farmacológica de AKT, en comparación con ratones inoculados con las células en estado natural. Como control, a ratones inoculados con ambas líneas se les administró PBS. Para estos experimentos se utilizaron las dosis subóptimas de metformina, siguiendo un esquema similar al experimento anterior.

El tamaño tumoral fue inferior en los ratones inoculados con Panc02 adaptadas a la inhibición de AKT en comparación con los demás grupos, bajo el tratamiento con metformina (Figura 44). Estos ratones tuvieron una supervivencia mediana de 61 días, que fue significativamente mayor en comparación con los ratones con Panc02 corrientes tratados con metformina (40 días, $p = 0.0225$), y también al comparar con ratones con Panc02 adaptadas a la inhibición de *AKT* tratadas con PBS (40 días, $p = 0.0451$)

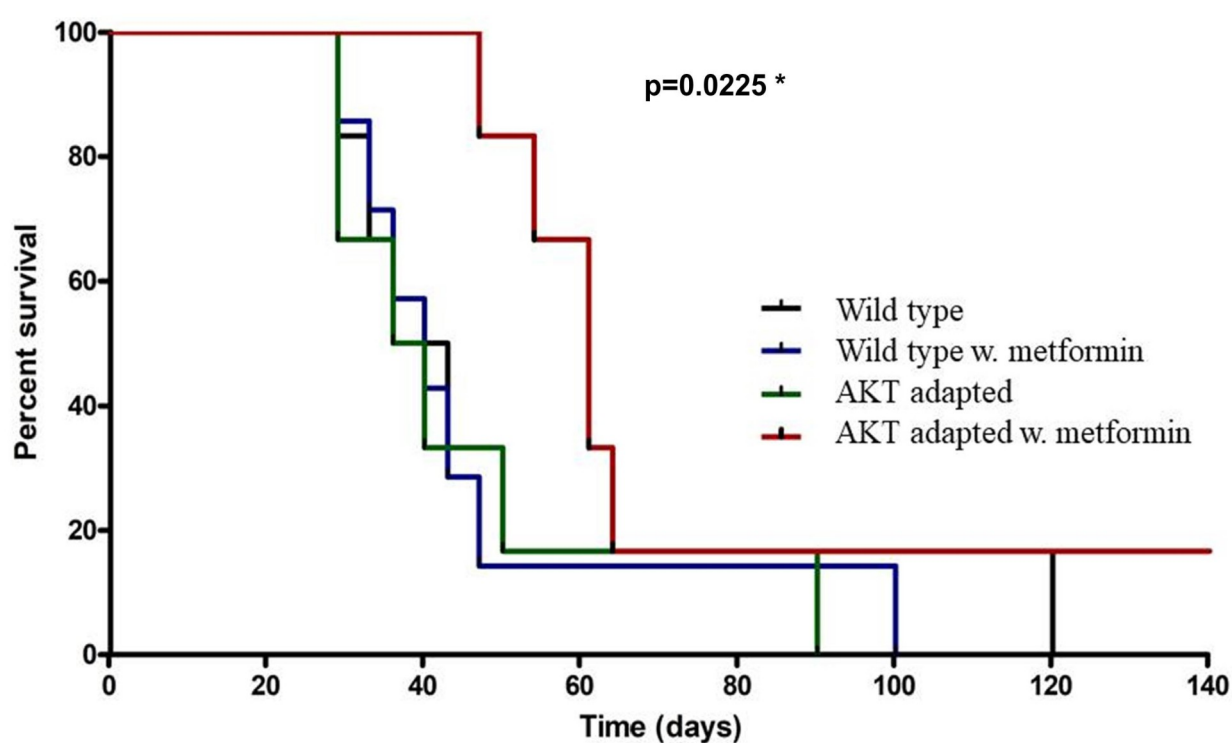


Figura 44. Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier representando la supervivencia de los ratones en función de la línea celular inoculada y el tratamiento recibido.

RESULTADOS

Estos resultados con células de adenocarcinoma de páncreas de ratón, análogos a los observados en los estudios con la línea humana AsPC-1, apoyan la extrapolabilidad de los datos obtenidos en experimentos realizados en el modelo *in vivo*. Los resultados también apoya la adquisición de características de SCS en las células adaptadas a la inhibición de *AKT*, ya que se ha demostrado por otros grupos que la metformina actúa mayoritariamente sobre las CSCs en cáncer de páncreas (Sancho P *et al*, 2015).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. ADAPTACIÓN A LA INHIBICIÓN SOSTENIDA DE AKT

Pese a la gran importancia de la vía PI3K/AKT/mTOR en adenocarcinoma de páncreas humano, los diferentes ensayos clínicos con fármacos dirigidos frente a esta han obtenido resultados mucho más discretos de lo que cabía esperar (El-Khoueiry AB *et al*, 2012; Iriana S *et al*, 2016; Javle MM *et al*, 2010; Kindler HL *et al*, 2012; Wolpin BM *et al*, 2009). La existencia de rutas de autorregulación negativa dependientes de mTOR, como pueden ser las de IRS-1 (Harrington LS *et al*, 2004; Kim SJ *et al*, 2012; Shah OJ *et al*, 2004), Grb10 (Yu Y *et al*, 2011), o AKT (Ben Sahra I *et al*, 2008; Soares HP *et al*, 2013), podría ser un factor fundamental que explique esta falta de eficacia. En concordancia con estos datos, en este proyecto hemos objetivado una adaptación de las células cancerosas al silenciamiento génico mantenido de *AKT*, inicialmente con una etapa de quiescencia de alrededor de 2 meses de duración, viendo a continuación una recuperación de las capacidades proliferativas. Uno de los aspectos que resulta más llamativo es la rápida proliferación de la línea celular en la que se ha silenciado *AKT1* una vez superado el periodo de estabilidad, presentando una velocidad de crecimiento incluso superior a la de la línea control. Esto también podría influir de forma decisiva en el efecto de las terapias en la práctica clínica, al compensar un posible control inicial de la enfermedad con una progresión más rápida tras la adaptación.

Por *Western Blot* hemos detectado además cambios cuantitativos en los niveles intracelulares de varias proteínas, entre las que destaca un aumento de la expresión de mTOR, que se encuentra corriente abajo de AKT. Tal y como se describe en el trabajo de Chandarlapay S *et al*. (Chandarlapay S *et al*, 2011), este silenciamiento de *AKT* puede inducir un aumento de la expresión de receptores tirosin-cinasa, entre ellos HER-3 (*human epithelial growth-factor receptor 3*), IGF1R o receptores de insulina, provocando una activación de diferentes rutas de señalización.

1.1. Función diferencial de las isoformas de AKT en adenocarcinoma de páncreas

Diferentes estudios preclínicos han demostrado funciones específicas de cada una de las isoformas de AKT, que además varían en función del tipo tumoral (Altomare DA *et al*, 2005; Arboleda MJ *et al*, 2003; Brown JS *et al*, 2016; Carpten JD *et al*, 2007; Chen ML *et al*, 2006; Cheng JQ *et al*, 1992

DISCUSIÓN

y 1996; Cheng GZ *et al*, 2007; Chin YR *et al*, 2014; Davies MA *et al*, 2008; Dillon RL *et al*, 2009; Easton RM *et al*, 2005; Hollander MC *et al*, 2011; Hutchinson JN *et al*, 2004; Irie HY *et al*, 2005; Ju X *et al*, 2007; Kim D *et al*, 2001; Linnerth-Petrik NM *et al*, 2007; Liu H *et al*, 2006; Maroulakou IG *et al*, 2007; Nakatani K *et al*, 1999; Roy HK *et al*, 2002; Stahl JM *et al*, 2004; Sun M *et al*, 2001; Tanno S *et al*, 2001; Virtakoivu R *et al*, 2012; Yoeli-Lerner M *et al*, 2005). En el caso del adenocarcinoma de páncreas, células que expresaban AKT1 y AKT2 constitutivamente activos tenían un mayor potencial invasivo (Tanno S *et al*, 2001), mientras que el silenciamiento de AKT2 tuvo un efecto antitumorogénico en un modelo murino de xenotransplante (Altomare DA *et al*, 2005; Cheng GZ *et al*, 2007). Nuestro proyecto aborda la cuestión desde una perspectiva distinta, dado que no evaluamos la función individual de las isoformas de AKT ni el efecto de su silenciamiento, si no la adaptación al mismo. La inhibición de *AKT* mediante ARN interferente (ARNi) bloqueó de forma muy marcada el crecimiento tumoral, dado que las células precisaron varios meses para alcanzar la confluencia en cultivo.

Tras la adaptación resultó evidente el cambio de fenotipo de las células en función de la isoforma de *AKT* silenciada, con células de aspecto fusiforme o espiroideo en el caso de AKT1, mientras que adquirirían una morfología cuboidea y distribución en empedrado en el caso de AKT2 y AKT3, lo que sugería una mayor diferenciación.

A continuación evaluamos la proliferación, apoptosis y crecimiento a tiempo real, y comprobamos como las células adaptadas al silenciamiento de cualquiera de las 3 isoformas presentaban una mayor apoptosis en comparación con la línea control, mientras que no había cambios significativos respecto a proliferación medida por la expresión del marcador surrogado ki67. Sin embargo al medir el crecimiento celular a tiempo real detectamos que, si bien las células que expresaban shAKT2 y shAKT3 una menor velocidad, en el caso de la línea que se había adaptado al silenciamiento de AKT1 el crecimiento era incluso mayor que la línea control. Este hallazgo puede tener dos lecturas: por un lado, AKT1 puede tener un papel importante en el control de la proliferación en adenocarcinoma de páncreas, y su silenciamiento puede provocar un efecto protumoral que favorezca la progresión; sin embargo, otra interpretación puede ser que las rutas de señalización que las células cancerosas han empleado para adaptarse y sobrevivir a la inhibición de *AKT1* induzcan un incremento franco del crecimiento tumoral.

DISCUSIÓN

1.2. Estudios de proteómica cuantitativa diferencial

Una importante limitación de los estudios antes mencionados es que llevan a cabo una evaluación mayormente funcional de las células modificadas, analizando características como proliferación, apoptosis, invasión o metástasis, o evaluando la expresión de determinadas proteínas. En este proyecto hemos llevado a cabo una caracterización completa del proteoma de las líneas modificadas, y una comparación cuantitativa con una línea control, lo que permite una visión global de los cambios acontecidos en las células para adaptarse al silenciamiento de *AKT*. Hasta la fecha no se han publicado estudios que analicen con este nivel de detalle los mecanismos de adaptación al silenciamiento específico de isoformas de *AKT*.

A pesar de que las estructuras de las isoformas de AKT son altamente homólogas, las proteínas alteradas de forma común tras su silenciamiento individual eran tan solo 20 de 475, alrededor de un 4%. No obstante, muchas de las rutas moleculares y procesos celulares afectados eran comunes y, al igual que en los experimentos de crecimiento tumoral en tiempo real, vimos grandes similitudes entre las líneas que expresaban shAKT2 y shAKT3 mientras que los datos de shAKT1 eran más divergentes.

En el caso de AKT1, la dependencia de la actividad mitocondrial parecía especialmente alta, dado que la mayor parte de las proteínas cuya expresión estaba aumentada se relacionan directa o indirectamente con funciones mitocondriales, entre ellas oxidación de ácidos grasos y respiración mitocondrial, además de favorecer la replicación de ADN mitocondrial y así aumentar la masa de esta organela. La oxidación de los ácidos grasos contribuye a la generación de acetil-CoA, que puede ser utilizado en el ciclo de Krebs para la producción de energía, biosíntesis de macromoléculas y generación de ROS. Respecto a AKT2 y AKT3, este estímulo de la función mitocondrial se asociaba a una disminución de la expresión de proteínas que participan en glicolisis y la ruta de las pentosas fosfato, lo que como ya hemos comentado sugiere la reversión del efecto Warburg.

Resulta llamativa la activación de un nodo relacionado con la ruta RTK/RAS/mTOR en la línea que expresa shAKT1; sin embargo este hallazgo lo hemos confirmado midiendo la expresión de mTOR por *Western Blot*. Podría estar relacionado con rutas de escape, como las que ya se han descrito en

DISCUSIÓN

la introducción que actúan en respuesta al silenciamiento de *mTOR*. No obstante, una explicación también plausible sería que, dado que AMPK regula negativamente la glicolisis aeróbica en respuesta al stress oxidativo (Faubert B *et al*, 2013), y que en las líneas celulares se ha producido un cambio para que el metabolismo pase a depender de la mitocondria, disminuya la actividad de AMPK e, indirectamente, se potencie mTOR.

Además, son comunes a las 3 isoformas el aumento de la expresión de un gran número de proteínas relacionadas con el funcionamiento de los ribosomas y del procesamiento del ARN, lo que indica un estado altamente anabólico que intenta favorecer el ciclo celular y la proliferación. Dado el aumento del metabolismo mitocondrial, las necesidades para mantener el equilibrio redox son menores, por lo que la traducción de genes relacionados con la defensa antioxidante, tanto relacionados con el glutathion o no, se encuentra reducida.

Un aspecto que estos hallazgos ponen de manifiesto es que, además de con mutaciones genéticas o cambios epigenéticos, las células cancerosas son capaces de escapar a las terapias mediante transformaciones que modifican de forma muy profunda el metabolismo tumoral. En este caso además, el silenciamiento específico de una única isoforma de una proteína concreta ha desencadenado cambios que afectan a las principales funciones celulares.

2. METABOLISMO MITOCONDRIAL

La ventaja del efecto Warburg en el cáncer es que permite satisfacer la alta demanda de energía de las células mientras que la respiración mitocondrial, si bien es más eficiente y obtiene 15 veces más ATP por cada molécula de glucosa, también es más lenta (Fogal V *et al*, 2010; Koppenol WH *et al*, 2011; Warburg O *et al*, 1956; Weinberg F *et al*, 2010; Weinberg SE *et al*, 2015). PI3K/AKT/mTOR es una de las principales rutas encargadas de regular la glicolisis aeróbica en las células cancerosas, y lo hace sin alterar la fosforilación oxidativa (Elstrom RL *et al*, 2004). Independientemente de la isoforma de AKT que se silencie, las 3 líneas modificadas presentan una potenciación de la función mitocondrial como mecanismo de adaptación. Sin embargo, sólo al silenciar *AKT2* y *AKT3* hemos visto una disminución de la expresión de las enzimas relacionadas con la glicolisis, y es precisamente en estas dos líneas en las que el crecimiento celular es significativamente menor en

DISCUSIÓN

comparación con la línea control, mientras que la línea que expresa shAKT1 conserva la vía de la glicólisis intacta y su proliferación es incluso superior al del control.

2.1. Aumento de masa mitocondrial y potenciación de la función mitocondrial

Con la tinción de MitoTracker Green FM, detectada y cuantificada por microscopía óptica, comprobamos como los cambios en proteínas mitocondriales detectados por la proteómica en las 3 líneas celulares se correlacionaba con un aumento de la masa mitocondrial. En diferentes trabajos se ha comprobado como las células madre cancerosas presentan mayor masa mitocondrial que las células tumorales diferenciadas, sugiriendo que podría ser el caso de nuestras líneas celulares modificadas (De Luca A *et al*, 2015; Farnie G *et al*, 2015; Lamb R *et al*, 2015). Utilizando la tecnología SeaHorse XF demostramos que este aumento de la masa también se asocia con un aumento de la función en la línea shAKT1, al detectar OCR más elevadas de tanto en estado basal como en situación de respiración máxima tras la adición de FCCP. Este aumento de la OCR sin cambios significativos en el flujo de protones implica una mayor capacidad en unas determinadas funciones mitocondriales, concretamente respiración relacionada con la síntesis de ATP y capacidad de reserva.

2.2. Sinergia de la inhibición de las isoformas de AKT con terapias dirigidas frente al metabolismo mitocondrial

En estudios preclínicos y ensayos clínicos se han evaluado la eficacia de fármacos cuyo efecto antitumoral se basa en la inhibición de la función mitocondrial, y uno de los que más interés ha despertado es la metformina. Esta biguanida basa su efecto en la inhibición del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial de forma cáncer específica, y en el estímulo de AMPK, tanto por aumento de AMP como por una mayor producción de H₂O₂ (Kaluanaraman B *et al*, 2017).

En cáncer de páncreas se ha detectado actividad antiproliferativa y radiosensibilizadora de este fármaco en estudios *in vivo* (Cheng G *et al*, 2016). Dada la alta dependencia del metabolismo mitocondrial de las células en las que hemos bloqueado las isoformas de AKT, era esperable una

DISCUSIÓN

mayor sensibilidad a este compuesto, como pudimos comprobar al observar una disminución de la IC50 en las 3 líneas celulares modificadas.

No obstante, puesto que por *Western Blot* habíamos detectado un aumento en la expresión de mTOR, y que esta terapia actúa indirectamente a este nivel por activación de AMPK, decidimos estudiar los efectos diferenciales de una segunda terapia dirigida frente a la mitocondria, tigeciclina. Este es un antibiótico de uso relativamente frecuente en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones que inhibe la traducción mitocondrial (Hu B *et al*, 2019). En este segundo experimento sólo vimos una disminución de la IC50 en la línea que expresaba shAKT1, lo que se podría explicar por ser el metabolismo mitocondrial su principal ruta de adaptación. En el caso de AKT2 y AKT3 la IC50 para tigeciclina era incluso superior, lo que puede estar justificado por la menor proliferación de estas líneas celulares.

2.3. Inhibición génica de las rutas de escape al silenciamiento mantenido de AKT

Otro método que utilizamos para confirmar la especial sensibilidad a las terapias dirigidas frente a la mitocondria fue el silenciamiento de genes mitocondriales en las líneas celulares ya modificadas mediante ARN interferente, que consigue una inhibición sostenida. Optamos por la línea adaptada a la inhibición de *AKT1* por presentar mayor sensibilidad a metformina y tigeciclina, además de una mayor velocidad de crecimiento, lo que haría más fácil de detectar los efectos del doble silenciamiento génico.

Las proteínas mitocondriales que elegimos como diana fueron algunas de las que por proteómica se detectaron con un aumento de la expresión, concretamente HARS2, SSBP1 y TFB2M. A diferencia de la primera transducción, no vimos fenotipos específicos tras el doble silenciamiento con los shARN dirigidos frente a estos genes. Sin embargo, las células presentaban un aspecto preapoptótico muy probablemente producido por las modificaciones genéticas repetidas, o por los largos periodos de tiempo sometidas a concentraciones tóxicas de antibióticos para poder llevar a cabo la selección.

Sólo tras el silenciamiento de *TFB2M* detectamos una disminución significativa de crecimiento, proliferación y un aumento de la apoptosis en comparación con la línea control. Estos datos podrían

DISCUSIÓN

explicarse posiblemente por la relevancia de su función, puesto que controla la transcripción del ADN mitocondrial. Es más, también fue únicamente en la línea celular que expresaba de forma simultánea shAKT1 y shTFB2M en la que detectamos una disminución de la masa mitocondrial medida por tinción con MitoTracker Green FM.

Estos datos sugieren que las células tumorales pueden inducir un cambio en su propio metabolismo para hacerse resistentes a diferentes tratamientos, aumentando el número y la función de las mitocondrias, en ocasiones en detrimento de la obtención de energía por glicolisis aeróbica. La combinación de terapias frente a la ruta PI3K/AKT/mTOR con tratamientos que inhiban la función mitocondrial podrían mejorar los pobres resultados que se han obtenido con las primeras en ensayos clínicos.

3. CÉLULAS MADRE CANCEROSAS

Varios trabajos independientes han destacado la gran relevancia de las células madre en el cáncer, y sus implicaciones respecto a la eficacia del tratamiento (Easwaran H *et al*, 1999; Gonçalves JM *et al*, 2018; Sinha N *et al*, 2013), al suponer un nicho de células resistentes a los tratamientos quimioterápicos habituales y con capacidad de regenerar el tumor. Algunas de los elementos que definen estas células son el estado de desdiferenciación por la transición epitelio-mesénquima (Heiler S *et al*, 2016; Thiery JP *et al*, 2009) o el aumento de masa y función mitocondrial (De Luca A *et al*, 2015; Farnie G *et al*, 2015; Lamb R *et al*, 2015; Ning X *et al*, 2016; Sancho P *et al*, 2015). En adenocarcinoma de páncreas además pueden ser relativamente quiescentes.

Como ya hemos mencionado, nuestras células modificadas presentaban algunas de estas características, y en el caso de la línea que expresaba shAKT1 se había detectado por proteómica una sobreexpresión de la enzima aldehído deshidrogenasa, que en algunos trabajos ha sido definida como un importante regulador de las CMC (Tomita H *et al*, 2016).

Para comprobar si tras el silenciamiento de las isoformas de *AKT* las células de adenocarcinoma de páncreas se habían desdiferenciado a CMC, estudiamos por citometría de flujo la expresión de marcadores clásicos de este subgrupo celular en las 3 líneas y en la línea control, viendo que

DISCUSIÓN

únicamente en el caso de AKT1 aumentaba la co-expresión de CD44 y EpCAM. Esto, junto con el cambio de fenotipo de las células que habíamos objetivado anteriormente, adoptando una morfología fusiforme, sugería que las células se habían adaptado al silenciamiento de *AKT1* mediante transformación en CMCs.

Los resultados que hemos obtenido tienen una muy alta concordancia con los hallazgos del estudio de Viale A *et al* (Viale A *et al*, 2014). Este trabajo desarrolla adenocarcinoma de páncreas en un modelo murino de *K-RAS* mutado inducible, y comprueba como al silenciar *K-RAS* se induce una regresión tumoral, persistiendo un nicho de células que expresan marcadores propios de células madre cancerosas (entre ellos CD44, de forma similar a los resultados presentados en esta tesis) y tienen una alta dependencia de la fosforilación oxidativa en detrimento de la glicolisis. Al igual que en nuestro caso, estas células presentan alto consumo de oxígeno y son muy sensibles a tratamientos dirigidos frente a la mitocondria, utilizando también tetraciclinas para este fin.

Por otro lado, resulta llamativo que únicamente tras el silenciamiento de *AKT1* se produzca esta desdiferenciación tan marcada de las células. Si consideramos también que sólo en esta línea celular hemos visto un aumento de la velocidad de crecimiento en comparación con el control, habría que plantearse que quizá la inhibición de *AKT1* podría tener un efecto perjudicial con el tiempo. Sin embargo, la mayor parte de terapias dirigidas frente a AKT actúan a nivel de las 3 isoformas, lo que también podría explicar en parte la falta de eficacia de estos tratamientos en los ensayos clínicos publicados hasta la fecha.

3.1. Desdiferenciación a células madre cancerosas

Hasta la fecha se ha descrito la transformación de un tumor por predominio de CMCs, pero el mecanismo se basa principalmente en la selección de dichas clonas debido a su refractariedad a los tratamientos (Aponte PM *et al*, 2017; Lathia JD *et al*, 2017). También, en dos trabajos recientes con modelos murinos de cáncer colorrectal se ha visto una desdiferenciación de las células cancerosas y adquisición de propiedades *stem-cell like* tras la eliminación de las CMCs, aunque no está claro qué factores son los que influyen en esta transformación, o si puede estar inducida por el microambiente (De Sousa e Melo F *et al*, 2017; Shimokawa M *et al*, 2017). De hecho, en el estudio de Shimokawa M *et al*, se vio una mayor eficacia antitumoral al combinar terapias dirigidas frente a las células

DISCUSIÓN

diferenciadas y frente a las CMCs.

Por otro lado, en el trabajo de Sancho P y colaboradores se objetivó cómo la resistencia de las CMCs de adenocarcinoma de páncreas al tratamiento con metformina se debía a una expansión de células con un metabolismo intermedio entre fosforilación oxidativa y glicolisis, y con mayor plasticidad metabólica y disminución de sus propiedades *stem cell-like*. No obstante, esto se interpretó como la consecuencia de la heterogeneidad del nicho de las CMCs que había favorecido la selección de clonas con estas características (Sancho P *et al*, 2015).

En nuestro proyecto obtenemos CMCs en cultivo celular partiendo de una línea celular no influenciada por el microambiente. Se trata de la primera evidencia hasta la fecha de que las células de adenocarcinoma de páncreas pueden desdiferenciarse y recuperar el fenotipo de CMCs como método de adaptación a determinadas terapias. Otra posibilidad que no se podría descartar es que las células menos diferenciadas, y por lo tanto con mayor potencial adaptativo y quizá un fenotipo *stem-cell like*, sean las únicas capaces de sobrevivir a la inhibición mantenida de AKT. No obstante, este fenómeno sólo se ha observado tras el silenciamiento de *AKT1*, y no en el caso de las otras dos isoformas de AKT. Estos datos sugieren que es una actividad específica de la inhibición de la primera e indica de todas formas una plasticidad metabólica que se adapta a diferentes circunstancias para asegurar la supervivencia celular. De acuerdo con estas observaciones, en las células con activación constitutiva de *c-MYC* hemos visto una reversión de este proceso de desdiferenciación tanto por expresión de marcadores de CMCs como a nivel metabólico, lo que apoya fuertemente nuestra interpretación y descarta una selección “inespecífica” basada en una mayor capacidad de las CMCs de ser transducidas con lentivectores.

Esta capacidad de adaptación de las células debería tenerse en cuenta en el diseño de ensayos para el tratamiento del adenocarcinoma de páncreas. Si no se incorporan fármacos que limiten la transformación de las células diferenciadas a CSCs, o dirigidos a erradicar este subgrupo celular, cabe la posibilidad de estar favoreciendo la expansión de una neoplasia de alta agresividad y resistente a los tratamientos convencionales.

DISCUSIÓN

4. EXPERIMENTOS *IN VIVO* EN MODELOS MURINOS

La finalidad de los experimentos *in vivo* que hemos realizado es comprobar si los resultados obtenidos en cultivo celular serían extrapolables, puesto que el organismo hospedador condiciona de forma muy significativa la evolución del cáncer, como paso intermedio para en última instancia poder trasladar los conocimientos a la investigación traslacional o clínica. Otro aspecto que es fundamental evaluar es si la inhibición farmacológica de AKT tiene un efecto similar al bloqueo de AKT mediante ARN interferente, dado que la aplicabilidad de los resultados sería mucho menor en caso de ser necesario el silenciamiento génico.

Hemos comprobado como la línea sometida durante un periodo de tiempo prolongado a concentraciones tóxicas de inhibidor de AKT presenta una menor velocidad de crecimiento, a pesar de que después se haya mantenido en medio de cultivo normal durante 7 días. Además, para sobrevivir al inhibidor de AKT las células aumentaron su masa mitocondrial, al igual que vimos con las líneas modificadas. Esto apoya de forma clara la transferibilidad de nuestros resultados y, además, sugiere que estamos observando una adaptación metabólica de células diferenciadas y no una selección de CSCs dentro de una población heterogénea.

En el modelo de adenocarcinoma de páncreas murino, la inhibición farmacológica de AKT disminuyó el crecimiento de los tumores. Con metformina también se objetivo un enlentecimiento de la progresión, aunque ligeramente menor que con *AKT inhibitor X*, posiblemente debido a la baja dependencia de las células del metabolismo mitocondrial. Sin embargo, la combinación del inhibidor de AKT y la metformina el crecimiento tumoral se enlenteció de forma significativa, presentando los ratones que recibieron ambos tratamientos de forma simultánea una supervivencia prolongada.

Esta sinergia entre la inhibición de AKT y metformina confirma que un mecanismo de resistencia preferente de las células de adenocarcinoma de páncreas al bloqueo de la vía PI3K/AKT consiste en la adaptación metabólica, con una alta dependencia de la función mitocondrial. El bloqueo de la cadena respiratoria mitocondrial impide este cambio en el metabolismo, siendo necesario un tiempo mayor hasta que la célula consigue hacerse resistente y desencadenar el crecimiento del tumor.

DISCUSIÓN

La realización de un experimento comparando la eficacia de metformina en células previamente adaptadas o no a la inhibición química de AKT confirma los hallazgos mencionados, e indica que, al igual que se demostró en el artículo de Sancho P *et al* con CSCs (Sancho P *et al*, 2015), las células diferenciadas también tienen una plasticidad metabólica que les permite alternar su fuente de obtención de energía en función de los estímulos recibidos. Posiblemente las diferencias en supervivencia de los ratones con la línea adaptada a *AKT inhibitor X* tratada con metformina sean de menor magnitud debido a que en este caso el estímulo que favorece la adopción de un fenotipo *stem-cell* ha cesado en el momento de la implantación de los tumores en los ratones, permitiendo a las células recuperar el metabolismo glicolítico. Esto no sucede en el experimento en el que administramos el inhibidor de AKT simultáneamente con terapias dirigidas frente a la mitocondria, en el que estaríamos impidiendo esta adaptación.

Junto con los resultados obtenidos en los estudios *in vitro* se puede concluir que las células tumorales se adaptan rápidamente a la inhibición de *AKT* adoptando un fenotipo *stem-cell like*, al abandonar la glicolisis aeróbica y potenciar la función mitocondrial. Estas células adaptadas posiblemente jueguen un papel fundamental en la resistencia a algunos tratamientos anticancerosos. Terapias dirigidas frente a la mitocondria pueden impedir esta adaptación, inducir apoptosis en las células transformadas, y así conseguir un mejor control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Las isoformas de AKT tienen funciones específicas en adenocarcinoma de páncreas. Tras su silenciamiento individual, las células adaptadas presentan cambios fenotípicos y funcionales diferenciales, incluyendo diferencias en proliferación, apoptosis espontánea e interactomas funcionales específicos.
2. La adaptación al silenciamiento de AKT1 implica un incremento de las funciones mitocondriales, incluyendo mayor masa mitocondrial, respiración aumentada, y la adopción de un fenotipo de célula madre cancerosa.
3. La adaptación al silenciamiento de las isoformas de AKT confiere alta sensibilidad frente a terapias dirigidas contra la mitocondria, que se traduce en sinergia entre la inhibición de AKT y bloqueantes de la respiración mitocondrial.
4. La combinación de terapias dirigidas a inhibir AKT y la respiración mitocondrial muestran sinergias en modelos murinos de adenocarcinoma de páncreas, aumentando la supervivencia.

ANEXO

PD1 signal transduction pathways in T cells

Hugo Arasanz^{1,*}, Maria Gato-Cañas^{1,*}, Miren Zuazo^{1,*}, Maria Ibañez-Vea^{1,*}, Karine Breckpot³, Grazyna Kochan¹ and David Escors^{1,2}

¹Immunomodulation Group, Navarrabiomed-Biomedical Research Centre, IdISNA, Pamplona, Spain

²Rayne Institute, Division of Infection and Immunity, University College London, London, United Kingdom

³Laboratory of Molecular and Cellular Therapy Department of Biomedical Sciences, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: David Escors, **email:** descorsm@navarra.es
Grazyna Kochan, **email:** grazyna.kochan@navarra.es

Keywords: PD-L1, PDL1, PD1, B7-H1, cancer

Received: February 28, 2017

Accepted: March 24, 2017

Published: April 19, 2017

Copyright: Arasanz et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

The use of immune checkpoint inhibitors for the treatment of cancer is revolutionizing oncology. Amongst these therapeutic agents, antibodies that block PD-L1/PD1 interactions between cancer cells and T cells are demonstrating high efficacies and low toxicities. Despite all the recent advances, very little is yet known on the molecular intracellular signaling pathways regulated by either PD-L1 or PD1. Here we review the current knowledge on PD1-dependent intracellular signaling pathways, and the consequences of disrupting PD1 signal transduction.

INTRODUCTION

Anti-cancer immunotherapies are finally becoming clinically efficacious after many decades of intense research and development. Amongst these, antibody-mediated disruption of programmed death ligand 1 (PD-L1)/programmed death receptor 1 (PD1) interactions is one of the most efficacious with milder adverse effects than chemo- and radiotherapy [1]. However, this therapy is not successful for all patients and the mechanisms underlying anti-PD1 blockade need to be explored. Important breakthroughs are continuously being made such as the identification of mutations in *JAK1*, *JAK2* and β 2-microglobulin genes associated to primary and acquired resistance to PD1 blockade therapy [2, 3].

PD1 is a type I transmembrane protein preferentially expressed in immune cells such as T, B and NK cells. PD-L1 is a member of the B7 family of co-stimulatory/co-inhibitory molecules of antigen presentation expressed by a wide range of cell types, including cancer cells. When engaged to its receptor PD-L1, PD1 strongly interferes with T cell receptor (TCR) signal transduction through several poorly understood molecular mechanisms. PD1 is made of an extracellular immunoglobulin-like binding

domain, a transmembrane region and a cytoplasmic domain containing an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) and an immunoreceptor tyrosine-based switch motif (ITSM) [4]. These motifs are implicated in its immunosuppressive effects. Interfering with PD1 signal transduction either by antibody blockade or any other means enhances T cell functions by potentiating signal transduction from the TCR signalosome. Here we review the known molecular pathways by which PD1 exerts its immunosuppressive functions in T cells.

ANTIGEN PRESENTATION TO THE T CELL

T cell activation and expansion is a complex process regulated by the interaction of several signaling pathways. T cells get activated and expand exponentially after encountering antigenic peptides specific for their cognate TCRs. Antigenic peptides are presented to T cells usually by professional antigen presenting cells (APCs) such as dendritic cells (DCs) through a highly regulated process called antigen presentation (Figure 1A). APCs capture and intracellularly process antigens from pathogens and cancer cells into short antigenic peptides which are loaded

into major histocompatibility molecules (peptide-MHC complexes, or pMHC) and then exposed to the surface. There, peptide-MHC complexes bind to the TCR within the immunological synapse (Figure 1A). This recognition entails the initial step of the activation of the TCR signaling cascade (signal 1). However, T cells need at least a second co-stimulatory signal to escape from anergy or apoptosis [5]. A wide range of stimulatory or inhibitory interactions between receptors on the T cell surface and their ligands on the surface of the APC lead to signal 2. Thus this signal 2 will determine the level of T cell activation. Possibly the most important co-stimulatory interaction is provided by CD80 on the APC binding to CD28 on the T cell. There is also a third signal delivered by cytokines which regulates T cell differentiation and effector capacities [6]. Then, other inhibitory interactions take place between the APC and the T cell which modulate the strength and duration of the stimulatory signals.

MECHANISMS OF T CELL ACTIVATION

At the molecular level, signal one is delivered by kinase-dependent pathways triggered when TCR-CD3 molecules are bound to pMHC complexes in the immunological synapse (Figure 1A). TCR-CD3 and co-receptor (CD4 or CD8) cross-linking results in tyrosine phosphorylation of the TCR-CD3 intracellular domains

by LCK and FYN kinases (Figure 1B). LCK also phosphorylates ZAP70 kinase which is then recruited to the CD3 ζ chain [7]. ZAP70 starts multiple signaling events through LAT phosphorylation and association to GRB2 and PLC γ 1, culminating with activation of the MAPKs ERK and JNK [8] involved in several cellular processes such as proliferation, differentiation, motility, stress response, apoptosis, and survival. PLC γ 1 produces diacyl glycerol (DAG) and inositol 1,4,5-triphosphate (IP $_3$) causing release of calcium ions from the ER and inducing NFAT and CREB translocation, which enhances IL2 transcription. Additionally, ZAP70 phosphorylates p38 associated to the scaffold protein DLGH1, resulting in its autophosphorylation at the activation loop by the so-called “alternative p38 activation pathway” which contributes to proliferation and cytokine production [9, 10].

Signal 2 (T cell co-stimulation) is exemplified by CD80-CD28 interactions between APCs and T cells (Figure 1). In this situation, LCK phosphorylates CD28 intracellular domain, providing a docking site for the PI3K complex. PI3K then generates phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP $_3$), that activates downstream kinases including AKT which enhances proliferation and survival through the mTOR pathway [11], and PKC θ which activates NF- κ B and MKK7, required for IL2 production. T cells require AKT and PKC θ activation to acquire full proliferative and effector activities.

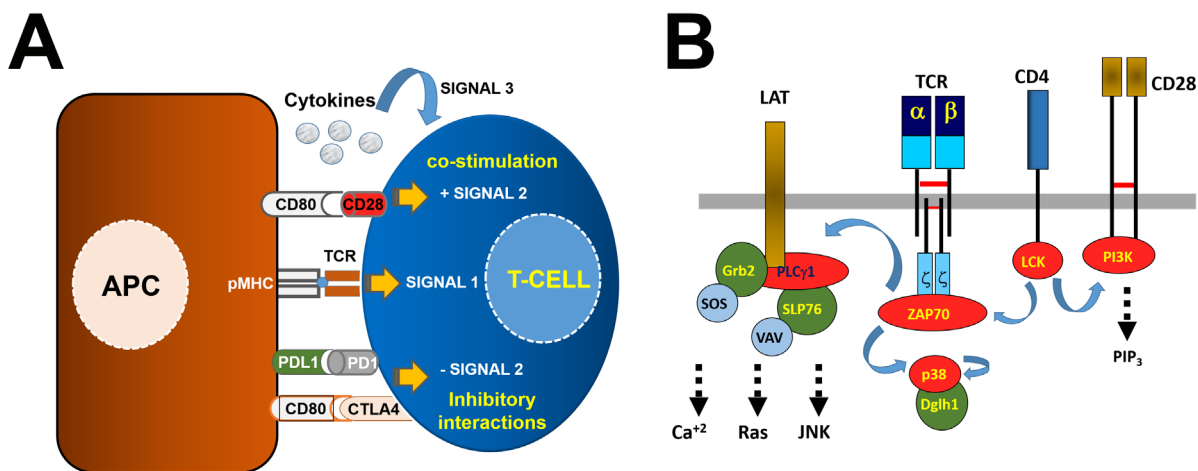


Figure 1: Antigen presentation and T cell activation through the T cell receptor signalosome. (A) T cells receive from antigen presenting cells (APCs, left of the picture) three signals. APCs present antigenic peptides complexed to MHC molecules (pMHC, as indicated) to T cells through binding to their TCR as shown. This interaction triggers intracellular signaling events (signal 1) as indicated within the T cell on the right. T cells simultaneously receive additional “positive” and “negative” signals through ligand-receptor interactions within the immunological synapse. On top is shown the co-stimulatory interaction driven by CD80-CD28, and below two inhibitory interactions between PD-L1/PD1 and CD80-CTLA4. The integration of these signals delivers a second signal regulating the extent of T cell activation. A third signal is also provided by cytokines (top). **(B)** Simplified scheme of the TCR signalosome including the $\alpha\beta$ TCR chains associated to CD3 molecules as indicated. In this example, only CD3 ζ dimers are shown. Signal 1 is initiated through $\alpha\beta$ TCR and CD4/CD8 molecules. This signal depends on LCK activation that phosphorylates CD3 and CD28 cytoplasmic domains. ZAP70 then binds to CD3 ζ and phosphorylates LAT and p38 as shown. Phosphorylated LAT recruits other enzymes and adaptor molecules as shown which will trigger calcium-dependent and MAPK-dependent pathways. Signal 2 depends on PI3K associated to CD28 when associated to CD80 on the surface of the APC. PI3K generates PIP $_3$ leading to proliferation and survival by regulating AKT-mTOR pathways. CD28 engagement prevents apoptosis and acts synergistically with CD3-dependent signals. In green, adaptor molecules. In red, kinases and phospholipase C.

Nevertheless, there are other associations between ligands and receptors in APCs and T cells (Figure 1A). Many of these will inhibit T cell activation to modulate their activities and have been extensively reviewed elsewhere [12].

DIRECT PATHWAYS OF PD1-DEPENDENT INHIBITION OF TCR SIGNAL TRANSDUCTION

Similarly to CD80-CTLA4, PD-L1/PD1 interactions are antagonists of CD80-CD28 co-stimulation. PD-L1-engaged PD1 strongly counteracts TCR signal transduction and CD28-co-stimulation even at very low PD1 expression levels. As a result, PD1 abrogates

cytokine production, causes cell cycle arrest and decreases transcription of the pro-survival factor Bcl-X_L [13]. In the direct pathway of TCR inhibition, engaged PD1 terminates ZAP70 and PI3K phosphorylation by recruiting SHP1 and SHP2 phosphatases to its tyrosine phosphorylated ITIM and ITSM motifs [14, 15] (Figure 2A). However, the specific mode of action is still poorly understood. Interestingly, only inactive mutations in the phosphorylatable ITSM tyrosine residues abolish PD1-inhibitory effects, but not in the ITIM motif [13]. SHP1 can also bind both ITIM and ITSM motifs, while SHP2 only binds the ITSM [14]. Nevertheless, whether SHP1 and SHP2 can simultaneously bind the ITSM is yet unknown (Figure 2A). It might be possible that binding of one prevents binding of the other, behaving like a

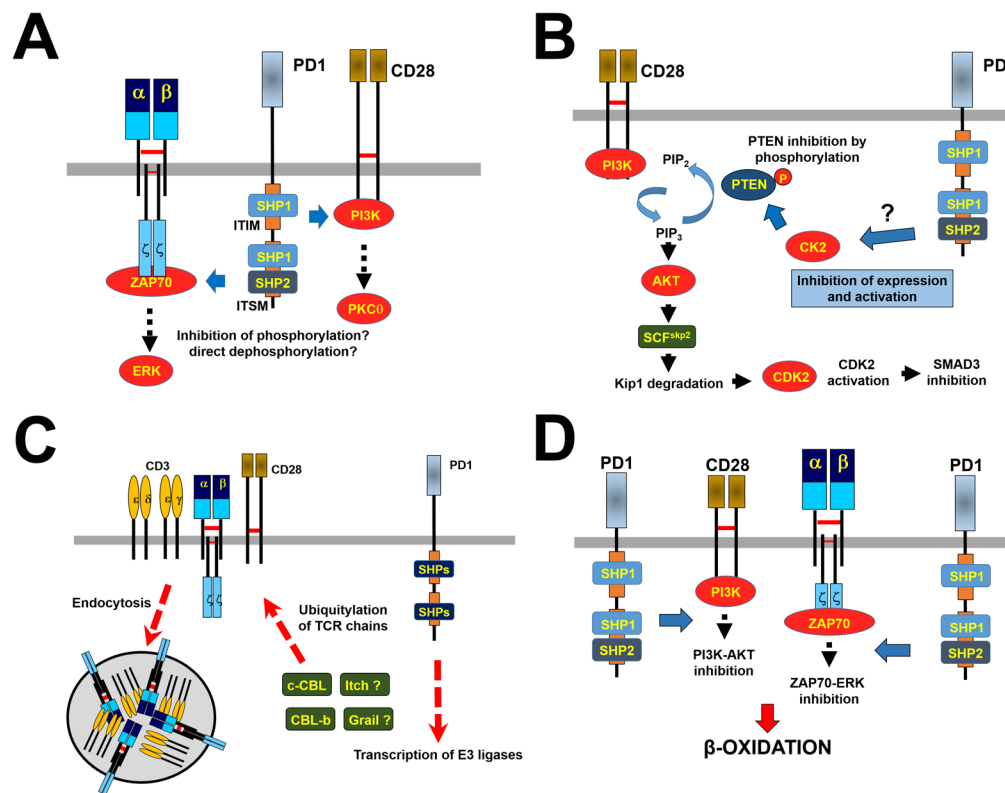


Figure 2: PD1-dependent inhibitory mechanisms. (A) Direct inhibitory mechanisms over the TCR signalosome are shown. The figure represents PD1-dependent proximal inhibitory mechanisms, which depend on the recruitment of SHP1 and SHP2 phosphatases as shown. These phosphatases inhibit ZAP70 and PI3K activities (blue arrows). Downstream intracellular pathways are also terminated, as exemplified in the figure with ERK and PKCθ. (B) Indirect inhibitory mechanisms over TCR signaling and T cell proliferation are shown through regulation of CK2 expression and activities. On the left, the PI3K-dependent signaling pathway activating CDK2 and inhibiting SMAD3 is shown. Briefly, PIP₃ activates AKT leading to production of the ubiquitin ligase SCF that degrades the CDK2 inhibitor Kip1. Activated CDK2 triggers cell cycle progression and inactivates SMAD3 by phosphorylation. These pathways are negatively regulated by the PTEN phosphatase that degrades PIP₃. During TCR activation CK2 phosphorylates PTEN with a concomitant decrease in its activities. When PD1 is engaged CK2 expression and activities decrease resulting in active PTEN that eliminates PIP₃, shutting off AKT activation. (C) Regulation of TCR surface expression by PD1. PD1 engagement promotes expression of E3 ubiquitin ligases of the CBL family, as shown. As indicated, other ligases may be up-regulated as well. These ubiquitin ligases ubiquitylate TCR chains and PI3K, leading to the removal of TCRs from the T cell surface, possibly by endocytosis. Thus, T cells cannot respond to antigenic stimulation. (D) Metabolic control by PD1. Engaged PD1 alters T cell metabolism from glycolysis to β-oxidation by inhibition of ERK and PI3K-AKT activities. PD1-stimulated T cells would then metabolically resemble long-lived memory T cells.

regulatory switch motif similar to the ITSM of CD150 [16] that may regulate PD1 activities. In agreement with this, SHP2 but not SHP1 has been observed associated to PD1 in microclusters within the immunological synapse [17]. All these evidences support SHP2 as the main driver of PD1 inhibitory functions. Unlike SHP2, it is yet unclear whether PD1-bound SHP1 really contributes to PD1 suppressive function [17]. Nevertheless, SHP1 can bind to tyrosine-phosphorylated substrates such as ZAP70 [18]. It is thought that it could follow a pathway similar to termination of “standard” TCR signal transduction upon T cell activation through SHP1 dephosphorylating ZAP70 [18]. Even so, it has to be remarked that direct dephosphorylation of TCR proximal signaling kinases by SHP1 and SHP2 associated to PD1 has not yet been demonstrated [14].

Engaged PD1 has to be recruited to the immunological synapse to exert its activities. Thus, TCR engagement with pMHC is sufficient to cause SHP2 recruitment to PD1, but no T cell suppressive effects are exerted unless PD1 is simultaneously ligated [13]. This would suggest that PD1-associated phosphatases need the proximity to the TCR signalosome to dephosphorylate signal transduction kinases in analogy to CTLA4 recruiting SHP2 to dephosphorylate CD3 ζ [13, 19]. The consequent inhibition of TCR-dependent distal signaling pathways such as ERK are probably the result of direct ZAP70 inhibition (Figure 2A).

INDIRECT PATHWAYS OF PD1-DEPENDENT INHIBITION OF TCR SIGNAL TRANSDUCTION

PD-L1-engaged PD1 exerts an additional indirect inhibitory control over CD28-costimulation by regulating the expression levels and activities of CK2 and cyclin-dependent kinases (CDKs) (Figure 2B) [20]. In the absence of PD1 engagement, TCR activation increases CK2 expression that inactivates PTEN by phosphorylation. Thus, PTEN cannot dephosphorylate PIP3 produced by PI3K allowing TCR signal transduction to proceed. Interestingly, engaged PD1 reduces CK2 expression and activity with the result of an active PTEN that terminates the PI3K-AKT- PKC θ pathway inhibiting T cell growth and survival [14].

Engaged PD1 arrests lymphocytes at the G0-G1 phase through an indirect pathway which inhibits CDKs (Figure 2B). The resulting inhibition of AKT and ERK either by direct or indirect pathways inhibits transcription of SKP2 (part of SCF^{Fskp2} ubiquitin ligase) (Figure 1A and 1B) [21]. SCF^{Fskp2} ubiquitin ligase normally tags the CDK2 inhibitor p27^{Kip1} to proteosomal degradation during T cell activation, driving CDK2-dependent cell division. Thus, PD1 activities cause an accumulation of p27^{Kip1} that associates with CDK2 inhibiting its kinase activities. CDK2 inhibition also eliminates the SMAD3 inhibiting

phosphorylation on Ser213, resulting in the expression of SMAD3-responsive genes including p15^{INK4B} (a potent inhibitor of CDK4 and CDK6), and repressing transcription of the tyrosine phosphatase CDC25A that normally removes inhibitory tyrosine phosphorylations of CDK4, CDK6 and CDK2 causing T cell arrest [22].

PD1 regulation of TCR down-modulation

Down-modulation and degradation of the TCR signalosome is a feature of T cells in cancer patients and animal cancer models, especially in tumor-infiltrating lymphocytes [23–25]. The most effective way to prevent T cells from recognizing antigens is to remove TCRs from their surface. Then, T cell function is severely impaired as a direct consequence of down-modulated TCRs and their associated receptors and signaling mediators (signalosome, Figure 1B and 2C). Cancer-associated TCR down-modulation is not caused by low affinity interactions with tumor antigens. This was demonstrated in a C-MYC-dependent OVA-expressing hepatocarcinoma murine model. Prolonged TCR down-modulation was observed in adoptively transferred OVA-specific transgenic CD8 OTI cells which have high affinity TCRs [26]. Thus, other mechanisms must be in place.

PD1 expression is characteristically high in tumor-infiltrating T cells [27, 28]. Thus, PD-L1-engaged PD1 contributes to prolonged TCR down-modulation by up-regulating the expression of E3-ubiquitin ligases CBL-B, c-CBL and ITCH which ultimately causes TCR internalization [29, 30] (Figure 2C). Interfering with PD-L1/PD1 interactions either with blocking antibodies or by gene silencing during antigen presentation to T cells leads to hyperactivated TCR^{high} T cells with decreased expression of c-CBL and CBL-b [30].

All the evidence shows that E3 ubiquitin ligases are closely linked to regulation of TCR levels and termination of TCR-dependent signal transduction. CBL-b and c-CBL double-knockout T cells exhibit impaired TCR down-modulation upon T cell activation, causing hyperactivation in the absence of CD28 co-stimulation [31]. CBL-b single knock-out T cells also show impaired TCR down-modulation during physiological immune responses or after antigen recognition, similarly to disruption of PD-L1/PD1 interactions [30, 32]. Mechanistically, CBL-b and ITCH cause K33-polyubiquitination of CD3 ζ , impairing its phosphorylation and the subsequent association of ZAP70 [33]. PI3K is also a direct target for CBL-b causing proteolysis-independent PI3K inactivation [34]. Overall, CBL-b negatively regulates CD28 co-stimulation in T cells [35, 36]. Thus, it is highly likely that the strong CD28-counteracting activities of PD1 could be partly caused by E3 ubiquitin ligases. It is worth noting that PD-L1 blockade also inhibits down-modulation of additional T cell activation markers such as ICOS, making PD1-driven

receptor down-modulation a major regulatory mechanism of T cell functions [30, 37].

PD1 control of T cell metabolism

It is well known that T cell activation requires a fast energy increase which is achieved by glycolysis-dependent metabolism. Interestingly, engaged PD1 may be fundamental to rapidly shift the metabolic reprogramming of T cells from an effector to a long-lived memory-like phenotype with a shift from increased glycolysis towards fatty acid β -oxidation [38, 39] (Figure 2D). It is thought that this metabolic change might extend the lifespan of PD1^{high} T cells. The exact molecular mechanisms are still unclear, although it could be mediated by PD1-dependent inhibition of PI3K and ERK. Thus, simultaneous inhibition of PI3K/AKT and ERK recapitulated some of PD1-dependent metabolic changes [39]. It is remarkable that PD1-engaged T cells closely resemble long-lived memory T cells from a metabolic point of view, when the current view is that sustained PD1 stimulation leads to T cell exhaustion. The implications of PD1 signaling in T cell differentiation will probably expand the accepted roles of PD1 as an immunosuppressive pathway.

FUNCTIONAL CONSEQUENCES OF PD-L1/PD1 DISRUPTION

The immune response is highly complex, and many factors can influence the outcome of immunotherapies. In addition, response patterns of PD-L1/PD1 blockade

therapy are strikingly different from those of chemotherapy or targeted therapies. Targeted therapies cause fast tumor remissions but with prompt acquisition of resistance (Figure 3). In contrast, patients who respond to PD-L1/PD1 blockade show significant and durable responses, although a delay of even months can be observed. From a clinical point of view there is a strong need to identify biomarkers that can predict the outcome of PD-L1/PD1 blockade. It is naturally assumed that PD-L1 expression in cancer cells would correlate with therapeutic outcome. However, the results from clinical trials differ on the usefulness of PD-L1 expression as a biomarker, as patients with PD-L1-positive and PD-L1-negative tumors may benefit from the treatment [1].

To explain the apparent contradictions observed in clinical trials we have first to consider that PD-L1/PD1 functions are context-specific. The regulatory functions of this interaction take place in at least three stages: (i) During antigen presentation to T cells [30]; (ii) in peripheral tissues to maintain tolerance [40, 41], and (iii) at the inflammation site to dampen excessive autoreactive damage [4, 40]. Thus, systemic disruption of PD-L1/PD1 interactions in cancer patients will unleash several events contributing to therapeutic efficacy but also to side effects:

Hyperactivation of naïve T cells undergoing antigen presentation

Systemic PD-L1/PD1 blockade very likely affects naïve T cells undergoing antigen presentation by professional APCs in lymphoid organs, as PD-L1 is

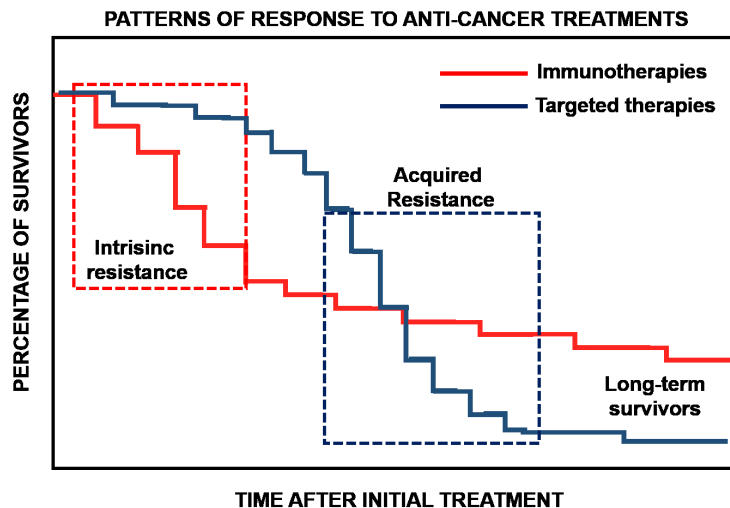


Figure 3: Immunotherapies and targeted therapies display distinct patterns of response. The graph displays a model of responses for immunotherapies and targeted therapies such as kinase inhibitors. The percentage of survival is plotted over time after the initial treatment. While targeted therapies exhibit fast anti-tumor effects, tumors acquire resistance to treatments. This is exemplified as a sudden drop of survival as indicated within the dotted square on the right. In contrast, immunotherapies show a significant group of patients that are intrinsically resistant to therapy, evidenced as an initial sudden drop in survival as indicated within the dotted square on the left. Then, long-term survivors are found with durable responses. So far, there are not effective biomarkers discriminating patients that could benefit from immunotherapies from those with intrinsic resistance.

normally highly expressed by professional APCs such as DCs [30, 40, 42]. PD-L1 expression is strongly up-regulated following DC maturation probably as a regulatory negative feedback mechanism. However, PD-L1/PD1 interactions play a critical role in physiological T cell activation during antigen presentation. Engaged PD1 in T cells during antigen presentation by DCs causes prolonged ligand-induced TCR down-modulation, which is followed by exponential clonal expansion rather than permanent T cell inactivation [30]. TCR surface expression is recovered within two weeks when a significant number of antigen-specific T cells have accumulated, ready to exert cytotoxic activities over target cells [43]. Disruption of PD-L1/PD1 interactions at this stage leads to hyperactivated TCR^{high} effector T cells which mediate an early immune attack [43, 44]. The resulting expansion of activated T cells from the pool of naïve T cells may enhance the anti-tumor response. Some evidence in preclinical models has been recently published which suggests that this could in fact be the case [45]. Moreover, interference of PD-L1/PD1 interactions during antigen presentation by DCs also favors that T cells do not lose their capacities to simultaneously express more than one cytokine (such as TNF- α , IL2, IFN- γ and MIP-1 β) [42], in agreement with the capacities of PD-L1/PD1 blockade to revert (or prevent) T cell exhaustion [46].

Recovery of T cell functions of cancer-specific memory T cells

Tumors are infiltrated with an array of immune cells which includes memory PD1+ T cells. These T cells are antigen-experienced but they have been inactivated by the tumor [47]. Reactivation of these experienced memory T cells might be the cause of the efficacy of PD-L1/PD1 blockade in patients with PD-L1-positive tumors [48]. These intra-tumor T cells usually lack expression of the TCR signalosome, and PD-L1/PD1 blockade may contribute to the recovery of TCR surface expression and signal transduction. The reactivation of this pool of antigen-experienced T cells seems to be the driver of the efficacy of PD-L1/PD1 blockade in human therapy [49]. In fact, T cell infiltration can be used as a predicting factor. Tumor infiltration with PD1^{high} CTLA4^{high} exhausted CD8 T cells can be an accurate predictor of response to anti-PD1 therapy in melanoma [50, 51].

Polyclonal expansion of T cells in peripheral tissue

PD-L1/PD1 interactions in peripheral tissues between many cell types and T cells ensure that circulating T cells do not react with autoantigens. This is also reinforced by the decreased expression of surface TCR in activated T cells during the clonal expansion phase [30, 43]. However, systemic disruption of PD-L1/PD1 may have a significant impact on antigen recognition in

peripheral tissue. In fact, it has been shown that local PD-L1 silencing in peripheral tissue expands polyclonal CD8 T cells [41] suggesting that systemic administration of PD-L1/PD1 blocking antibodies may expand a polyclonal pool of T cells following antigen recognition in peripheral tissues. The nature of these T cells has not been elucidated yet, but these reactivated T cells may be behind of some of the autoreactive adverse events associated to treatments with immune checkpoint inhibitors [52, 53]. Nevertheless, these T cells may also contain a significant pool of tumor antigen-specific cells that can be recruited to the tumor environment.

Direct effects over cancer cells

The current conventional view states that direct disruption of PD-L1/PD1 interactions between cancer and T cells is behind the therapeutic efficacy of blocking antibodies. However, PD-L1/PD1 interactions may also take place between melanoma cells in the absence of T cells [54]. This suggests that a minor population of melanoma cells may express some PD1 on their surface. Elimination of PD1 expression in murine mouse melanoma models and also in human xenografts inhibited cancer cell growth. Antibody-mediated disruption of this interaction directly delayed tumor growth without the need of enhanced T cell anti-tumor activities. The same result was achieved by either PD1 silencing or PD-L1 silencing in tumor cells [41, 54]. Thus, intercellular PD-L1/PD1 interactions transmit survival signals to cancer cells and promote *in vivo* tumor growth. Therefore, disruption of PD-L1/PD1 interactions between cancer cells will delay tumor growth while anti-cancer T cells become activated [41].

CONCLUSIONS

PD-L1/PD1 antibody blockade has yielded encouraging results for the treatment of a wide range of cancer types. The exact molecular and cellular mechanisms behind its potent anti-cancer activities are still poorly understood. PD1 engagement by PD-L1 leads to rapid termination of TCR intracellular signaling and inhibition of T cell proliferation through direct and indirect mechanisms. Most of the evidence points to SHP-2 recruitment as the main driver of all these mechanisms. However, it has to be mentioned that many experimental evidences so far come from immortal Jurkat T cells. Therefore, it cannot be ruled out that PD1 employs other yet unknown pathways to disrupt TCR signaling cascades and alter T cell metabolism.

A key issue with PD-L1/PD1 blockade therapy is the identification of predictive markers of response. Recently, inactivating mutations in the interferon signal transduction pathway and in class I antigen presentation have been shown to correlate with both primary and adaptive resistance to anti-PD1 therapy treatment [2, 3].

Therefore, there is a frantic need to identify alternative targets susceptible of therapeutic intervention that could minimize cancer cell escape. The tumor environment is a complex system in which many cell types cooperate to protect it, including myeloid-derived suppressor cells, tumor-infiltrating macrophages, regulatory T cells and other cell types of the tumor stroma [55–58]. Many of these cell types utilize the PD-L1/PD1 signaling axis to suppress anti-tumor immune responses. Therefore, the understanding of the mechanisms behind PD1-dependent cell suppression will surely uncover a number of novel targets susceptible of therapeutic intervention.

During the last years, therapies targeting main regulatory components of the immune synapse have been developed and are progressively displacing chemotherapy in different clinical contexts [1, 51, 59, 60]. Preliminary results from the simultaneous blockade of PD1 and CTLA4 in metastatic melanoma were also published, and now this combination is being tested in many different neoplasms [61, 62]. The better understanding of the signaling pathways underlying the immune response has revealed potential targets that might improve the efficacy of the current treatments. Many new drugs are now under evaluation, both potentiating co-stimulatory molecules such as 4-1BB, OX40, CD27, CD40, GITR, or blocking immunosuppressive proteins including LAG-3 or VISTA [63–65]. Their efficacy in combination with PDL1/PD1 blockade and CTLA4-targeted therapies will surely be reported in the near future.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

MGC is funded by a Government of Navarre PhD fellowship (BMED 033-2014); MZ is funded by a Gobierno de Navarra Project grant (GN 33/14) and a “Precipita” crowdfunding project grant from Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT). MIV is funded by a Sara Borrel post-doctoral fellowship. DE is funded by a “Miguel Servet” Fellowship (CP12/03114) from the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Spain. GK is funded by a “Proyecto Tractor ProCel” from the Government of Navarre. The authors gratefully acknowledge the “Sandra Ibarra” Foundation, the “Navarrese Association against Breast Cancer” (SARAY), “Caixa Foundation” and ISCIII (FIS. PI14/00579 project grant) for their financial support.

REFERENCES

1. Gato-Cañás M, Arasanz H, Blanco-Luquin I, Glaría E, Arteta-Sanchez V, Kochan G, Escors D. Novel immunotherapies for the treatment of melanoma. *Immunotherapy*. 2016; 8:613–32.
2. Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, Kalbasi A, Grasso CS, Hugo W, Sandoval S, Torrejon DY, Palaskas N, Rodriguez GA, Parisi G, et al. Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov*. 2017; 7:188–201.
3. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet Moreno B, Mezzadra R, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med*. 2016; 375:819–29.
4. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*. 2007; 8:239–45.
5. Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol*. 2003; 171:5165–71.
6. Curtsinger JM, Lins DC, Mescher MF. Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med*. 2003; 197:1141–51.
7. Chan AC, Iwashima M, Turck CW, Weiss A. ZAP-70: a 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR zeta chain. *Cell*. 1992; 71:649–62.
8. Sieh M, Batzer A, Schlessinger J, Weiss A. GRB2 and phospholipase C-gamma 1 associate with a 36- to 38-kilodalton phosphotyrosine protein after T-cell receptor stimulation. *Mol Cell Biol*. 1994; 14:4435–42.
9. Round JL, Humphries LA, Tomassian T, Mittelstadt P, Zhang M, Miceli MC. Scaffold protein Dlg1 coordinates alternative p38 kinase activation, directing T cell receptor signals toward NFAT but not NF-kappaB transcription factors. *Nat Immunol*. 2007; 8:154–61.
10. Salvador JM, Mittelstadt PR, Guszczynski T, Copeland TD, Yamaguchi H, Appella E, Fornace AJ Jr, Ashwell JD. Alternative p38 activation pathway mediated by T cell receptor-proximal tyrosine kinases. *Nat Immunol*. 2005; 6:390–95.
11. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. 1995; 3:87–98.
12. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13:227–42.
13. Chemnitz JM, Parry RV, Nichols KE, June CH, Riley JL. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*. 2004; 173:945–54.
14. Sheppard KA, Fitz LJ, Lee JM, Benander C, George JA, Wooters J, Qiu Y, Jussif JM, Carter LL, Wood CR, Chaudhary D. PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and

- downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 2004; 574:37–41.
15. Hui E, Cheung J, Zhu J, Su X, Taylor MJ, Wallweber HA, Sasmal DK, Huang J, Kim JM, Mellman I, Vale RD. T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. *Science.* 2017; 355:1428–33.
 16. Shlapatska LM, Mikhalap SV, Berdova AG, Zelensky OM, Yun TJ, Nichols KE, Clark EA, Sidorenko SP. CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol.* 2001; 166:5480–87.
 17. Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J Exp Med.* 2012; 209:1201–17.
 18. Plas DR, Johnson R, Pingel JT, Matthews RJ, Dalton M, Roy G, Chan AC, Thomas ML. Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling. *Science.* 1996; 272:1173–76.
 19. Lee KM, Chuang E, Griffin M, Khattri R, Hong DK, Zhang W, Straus D, Samelson LE, Thompson CB, Bluestone JA. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science.* 1998; 282:2263–66.
 20. Patsoukis N, Li L, Sari D, Petkova V, Boussiotis VA. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol Cell Biol.* 2013; 33:3091–98.
 21. Patsoukis N, Brown J, Petkova V, Liu F, Li L, Boussiotis VA. Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci Signal.* 2012; 5:ra46.
 22. Patsoukis N, Sari D, Boussiotis VA. PD-1 inhibits T cell proliferation by upregulating p27 and p15 and suppressing Cdc25A. *Cell Cycle.* 2012; 11:4305–09.
 23. Mizoguchi H, O'Shea JJ, Longo DL, Loeffler CM, McVicar DW, Ochoa AC. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science.* 1992; 258:1795–98.
 24. Finke JH, Zea AH, Stanley J, Longo DL, Mizoguchi H, Tubbs RR, Wiltrout RH, O'Shea JJ, Kudoh S, Klein E, Bukowski RM, Ochoa AC. Loss of T-cell receptor zeta chain and p56lck in T-cells infiltrating human renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1993; 53:5613–16.
 25. Massaia M, Attisano C, Beggiato E, Bianchi A, Pileri A. Correlation between disease activity and T-cell CD3 zeta chain expression in a B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 1994; 88:886–88.
 26. Ney JT, Schmidt T, Kurts C, Zhou Q, Eckert D, Felsher DW, Schorle H, Knolle P, Tüting T, Barchet W, Büttner R, Limmer A, Gütgemann I. Autochthonous liver tumors induce systemic T cell tolerance associated with T cell receptor down-modulation. *Hepatology.* 2009; 49:471–81.
 27. Chou JP, Effros RB. T cell replicative senescence in human aging. *Curr Pharm Des.* 2013; 19:1680–98.
 28. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol.* 2013; 25:214–21.
 29. Nurieva R, Thomas S, Nguyen T, Martin-Orozco N, Wang Y, Kaja MK, Yu XZ, Dong C. T-cell tolerance or function is determined by combinatorial costimulatory signals. *EMBO J.* 2006; 25:2623–33.
 30. Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, Arce F, Bennett CL, Collins M, Escors D. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol Med.* 2011; 3:581–92.
 31. Naramura M, Jang IK, Kole H, Huang F, Haines D, Gu H. c-Cbl and Cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation. *Nat Immunol.* 2002; 3:1192–99.
 32. Shamim M, Nanjappa SG, Singh A, Plisch EH, LeBlanc SE, Walent J, Svaren J, Seroogy C, Suresh M. Cbl-b regulates antigen-induced TCR down-regulation and IFN- γ production by effector CD8 T cells without affecting functional avidity. *J Immunol.* 2007; 179:7233–43.
 33. Huang H, Jeon MS, Liao L, Yang C, Elly C, Yates JR 3rd, Liu YC. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor-zeta regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity.* 2010; 33:60–70.
 34. Fang D, Liu YC. Proteolysis-independent regulation of PI3K by Cbl-b-mediated ubiquitination in T cells. *Nat Immunol.* 2001; 2:870–75.
 35. Bachmaier K, Krawczyk C, Kozieradzki I, Kong YY, Sasaki T, Oliveira-dos-Santos A, Mariathasan S, Bouchard D, Wakeham A, Itie A, Le J, Ohashi PS, Sarosi I, et al. Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b. *Nature.* 2000; 403:211–16.
 36. Chiang YJ, Kole HK, Brown K, Naramura M, Fukuhara S, Hu RJ, Jang IK, Gutkind JS, Shevach E, Gu H. Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation. *Nature.* 2000; 403:216–20.
 37. Karunarathne DS, Horne-Debets JM, Huang JX, Faleiro R, Leow CY, Amante F, Watkins TS, Miles JJ, Dwyer PJ, Stacey KJ, Yarski M, Poh CM, Lee JS, et al. Programmed Death-1 Ligand 2-Mediated Regulation of the PD-L1 to PD-1 Axis Is Essential for Establishing CD4(+) T Cell Immunity. *Immunity.* 2016; 45:333–45.
 38. Rathmell JC, Vander Heiden MG, Harris MH, Frauwirth KA, Thompson CB. In the absence of extrinsic signals, nutrient utilization by lymphocytes is insufficient to maintain either cell size or viability. *Mol Cell.* 2000; 6:683–92.
 39. Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, Bell LN, Karoly ED, Freeman GJ, Petkova V, Seth P, Li L, Boussiotis VA. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming

- by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun.* 2015; 6:6692.
40. Latchman YE, Liang SC, Wu Y, Chernova T, Sobel RA, Klemm M, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:10691–96.
 41. Liechtenstein T, Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Goyvaerts C, Schwarze J, Dufait I, Lanna A, Ridder M, Guerrero-Setas D, Breckpot K, Escors D. Anti-melanoma vaccines engineered to simultaneously modulate cytokine priming and silence PD-L1 characterized using *ex vivo* myeloid-derived suppressor cells as a readout of therapeutic efficacy. *OncoImmunology.* 2014; 3:e945378.
 42. Pen JJ, Keersmaecker BD, Heirman C, Corthals J, Liechtenstein T, Escors D, Thielemans K, Breckpot K. Interference with PD-L1/PD-1 co-stimulation during antigen presentation enhances the multifunctionality of antigen-specific T cells. *Gene Ther.* 2014; 21:262–71.
 43. Karwacz K, Arce F, Bricogne C, Kochan G, Escors D. PD-L1 co-stimulation, ligand-induced TCR down-modulation and anti-tumor immunotherapy. *OncoImmunology.* 2012; 1:86–88.
 44. Bricogne C, Laranga R, Padella A, Dufait I, Liechtenstein T, Breckpot K, Kochan G, Escors D. Critical Mass Hypothesis of T-Cell Responses and its Application for the Treatment of T-Cell Lymphoma. In: Harvey WK, Jacobs RM, editors. *Hodgkin's and T-cell lymphoma: Diagnosis, Treatment Options and Prognosis.* Nova Publishers; 2012.
 45. Homet Moreno B, Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Tsoi J, Parisi G, Robert L, Meeth K, Ndoye A, Bosenberg M, Weeraratna AT, Graeber TG, Comin-Anduix B, Hu-Lieskovan S, Ribas A. Response to Programmed Cell Death-1 Blockade in a Murine Melanoma Syngeneic Model Requires Costimulation, CD4, and CD8 T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4:845–57.
 46. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 2010; 207:2187–94.
 47. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature.* 2014; 515:568–71.
 48. Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, Seja E, Kivork C, Siebert J, Kaplan-Lefko P, Wang X, Chmielowski B, Glaspy JA, et al. PD-1 Blockade Expands Intratumoral Memory T Cells. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4:194–203.
 49. Kamphorst AO, Wieland A, Nasti T, Yang S, Zhang R, Barber DL, Konieczny BT, Daugherty CZ, Koenig L, Yu K, Sica GL, Sharpe AH, Freeman GJ, et al. Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1-targeted therapies is CD28-dependent. *Science.* 2017; 355:1423–27.
 50. Daud AI, Loo K, Pauli ML, Sanchez-Rodriguez R, Sandoval PM, Taravati K, Tsai K, Nosrati A, Nardo L, Alvarado MD, Algazi AP, Pampaloni MH, Lobach IV, et al. Tumor immune profiling predicts response to anti-PD-1 therapy in human melanoma. *J Clin Invest.* 2016; 126:3447–52.
 51. Hodi FS, Hwu WJ, Kefford R, Weber JS, Daud A, Hamid O, Patnaik A, Ribas A, Robert C, Gangadhar TC, Joshua AM, Hersey P, Dronca R, et al. Evaluation of Immune-Related Response Criteria and RECIST v1.1 in Patients With Advanced Melanoma Treated With Pembrolizumab. *J Clin Oncol.* 2016; 34:1510–17.
 52. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366:2455–65.
 53. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366:2443–54.
 54. Kleffel S, Posch C, Barthel SR, Mueller H, Schlapbach C, Guenova E, Elco CP, Lee N, Juneja VR, Zhan Q, Lian CG, Thomi R, Hoetzenecker W, et al. Melanoma Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Functions Promote Tumor Growth. *Cell.* 2015; 162:1242–56.
 55. Dufait I, Schwarze JK, Liechtenstein T, Leonard W, Jiang H, Escors D, De Ridder M, Breckpot K, De Ridder M, Breckpot K. *Ex vivo* generation of myeloid-derived suppressor cells that model the tumor immunosuppressive environment in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2015; 6:12369–82. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3682>.
 56. Liechtenstein T, Perez-Janices N, Gato M, Caliendo F, Kochan G, Blanco-Luquin I, Van der Jeught K, Arce F, Guerrero-Setas D, Fernandez-Irigoyen J, Santamaria E, Breckpot K, Escors D. A highly efficient tumor-infiltrating MDSC differentiation system for discovery of anti-neoplastic targets, which circumvents the need for tumor establishment in mice. *Oncotarget.* 2014; 5:7843–57. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2279>.
 57. Gato-Cañas M, Martínez de Morentin X, Blanco-Luquin I, Fernandez-Irigoyen J, Zudaire I, Liechtenstein T, Arasanz H, Lozano T, Casares N, Chaikuad A, Knapp S, Guerrero-Setas D, Escors D, et al. A core of kinase-regulated interactomes defines the neoplastic MDSC lineage. *Oncotarget.* 2015; 6:27160–75. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4746>.
 58. Simpson TR, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch JV, Allison JP, Quezada SA. Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med.* 2013; 210:1695–710.
 59. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warchocha E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbé C, et al. Nivolumab in

- previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015; 372:320–30.
60. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, Chow LQ, Vokes EE, Felip E, Holgado E, Barlesi F, Kohlhäufel M, Arrieta O, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 2015; 373:1627–39.
 61. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 373:23–34.
 62. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, Linette GP, Meyer N, Giguere JK, Agarwala SS, Shaheen M, Ernstoff MS, Minor D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 372:2006–17.
 63. Youlin K, Li Z, Xiaodong W, Xiuheng L, Hengchen Z. Combination immunotherapy with 4-1BBL and CTLA-4 blockade for the treatment of prostate cancer. *Clinical & developmental immunology.* 2012; 2012:439235.
 64. Wang L, Rubinstein R, Lines JL, Wasiuk A, Ahonen C, Guo Y, Lu LF, Gondek D, Wang Y, Fava RA, Fiser A, Almo S, Noelle RJ. VISTA, a novel mouse Ig superfamily ligand that negatively regulates T cell responses. *J Exp Med.* 2011; 208:577–92.
 65. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature reviews.* 2007; 7:95-106. <https://doi.org/10.1038/nrc2051>.

BIBLIOGRAFÍA

Adam J, Hatipoglu E, O'Flaherty L, Ternette N, Sahgal N, Lockstone H, Baban D, Nye E, Stamp GW, Wolhuter K, Stevens M, Fischer R, Carmeliet P, Maxwell PH, Pugh CW, Frizzell N, Soga T, Kessler BM, El-Bahrawy M, Ratcliffe PJ, Pollard PJ. Renal cyst formation in Fh1-deficient mice is independent of the Hif/Phd pathway: roles for fumarate in KEAP1 succination and Nrf2 signaling. *Cancer Cell*. 2011 Oct 18;20(4):524-37.

Agarwal B, Abu-Hamda E, Molke KL, Correa AM, Ho L. Endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration and multidetector spiral CT in the diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol*. 2004 May;99(5):844-50.

Agnello M, Morici G, Rinaldi AM. A method for measuring mitochondrial mass and activity. *Cytotechnology*. 2008 Mar;56(3):145-9. doi: 10.1007/s10616-008-9143-2. Epub 2008 Jun 24.

Akita H, Marquardt JU, Durkin ME, Kitade M, Seo D, Conner EA, Andersen JB, Factor VM, Thorgeirsson SS. MYC activates stem-like cell potential in hepatocarcinoma by a p53-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2014 Oct 15;74(20):5903-13.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J*. 1996 Dec 2;15(23):6541-51.

Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 2005 Nov 14;24(50):7455-64.

Andea A, Sarkar F, Adsay VN. Clinicopathological correlates of pancreatic intraepithelial neoplasia: a comparative analysis of 82 cases with and 152 cases without pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol*. 2003 Oct;16(10):996-1006.

Ansary-Moghaddam A, Huxley R, Barzi F, Lawes C, Ohkubo T, Fang X, Jee SH, Woodward M; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. The effect of modifiable risk factors on pancreatic cancer mortality in populations of the Asia-Pacific region. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Dec;15(12):2435-40.

Aponte PM, Caicedo A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their

Microenvironment. *Stem Cells Int.* 2017;2017:5619472. doi: 10.1155/2017/5619472. Epub 2017 Apr 4.

Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, Shu XO, Steplowski E, Bueno-de-Mesquita HB, Fuchs CS, Gross MD, Jacobs EJ, Lacroix AZ, Petersen GM, Stolzenberg-Solomon RZ, Zheng W, Albanes D, Amundadottir L, Bamlet WR, Barricarte A, Bingham SA, Boeing H, Boutron-Ruault MC, Buring JE, Chanock SJ, Clipp S, Gaziano JM, Giovannucci EL, Hankinson SE, Hartge P, Hoover RN, Hunter DJ, Hutchinson A, Jacobs KB, Kraft P, Lynch SM, Manjer J, Manson JE, McTiernan A, McWilliams RR, Mendelsohn JB, Michaud DS, Palli D, Rohan TE, Slimani N, Thomas G, Tjønneland A, Tobias GS, Trichopoulos D, Virtamo J, Wolpin BM, Yu K, Zeleniuch-Jacquotte A, Patel AV; Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Arch Intern Med.* 2010 May 10;170(9):791-802.

Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):209-19.

Aune D, Chan DS, Vieira AR, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, Cade JE, Burley VJ, Norat T. Dietary fructose, carbohydrates, glycemic indices and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Ann Oncol.* 2012 Oct;23(10):2536-46. Epub 2012 Apr 26.

Aune D, Vieira AR, Chan DS, Navarro Rosenblatt DA, Vieira R, Greenwood DC, Cade JE, Burley VJ, Norat T. Height and pancreatic cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Cancer Causes Control.* 2012 Aug;23(8):1213-22.

Bae JM, Lee EJ, Guyatt G. Citrus fruit intake and pancreatic cancer risk: a quantitative systematic review. *Pancreas.* 2009 Mar;38(2):168-74.

Bao Y, Michaud DS. Physical activity and pancreatic cancer risk: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 Oct;17(10):2671-82.

Bardella C, Pollard PJ, Tomlinson I. SDH mutations in cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1807(11):1432-43.

Becker AE, Hernandez YG, Frucht H, Lucas AL. Pancreatic ductal adenocarcinoma: risk factors, screening, and early detection. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 28;20(32):11182-98.

Ben Q, Xu M, Ning X, Liu J, Hong S, Huang W, Zhang H, Li Z. Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47(13):1928-37.

Ben Sahra I, Laurent K, Giuliano S, Larbret F, Ponzio G, Gounon P, Le Marchand-Brustel Y, Giorgetti-Peraldi S, Cormont M, Bertolotto C, Deckert M, Auberger P, Tanti JF, Bost F. Targeting cancer cell metabolism: the combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2010 Mar 15;70(6):2465-75.

Berrington de Gonzalez A, Sweetland S, Spencer E. A meta-analysis of obesity and the risk of pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2003 Aug 4;89(3):519-23.

Bhat TA, Kumar S, Chaudhary AK, Yadav N, Chandra D. Restoration of mitochondria function as a target for cancer therapy. *Drug Discov Today*. 2015 May;20(5):635-43.

Bilimoria KY, Bentrem DJ, Ko CY, Ritchey J, Stewart AK, Winchester DP, Talamonti MS. Validation of the 6th edition AJCC Pancreatic Cancer Staging System: report from the National Cancer Database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):738-44.

Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, Parmigiani G, Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Eshleman JR, Goggins M, Jaffee EM, Iacobuzio-Donahue CA, Maitra A, Cameron JL, Olin K, Schulick R, Winter J, Herman JM, Laheru D, Klein AP, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE, Hruban RH. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 15;15(14):4674-9.

Ben Sahra I, Laurent K, Loubat A, Giorgetti-Peraldi S, Colosetti P, Auberger P, Tanti JF, Le Marchand-Brustel Y, Bost F. The antidiabetic drug metformin exerts an antitumoral effect in vitro and in vivo through a decrease of cyclin D1 level. *Oncogene*. 2008 Jun 5;27(25):3576-86.

Bonovas S, Filioussi K, Sitaras NM. Statins are not associated with a reduced risk of pancreatic cancer at the population level, when taken at low doses for managing hypercholesterolemia: evidence from a meta-analysis of 12 studies. *Am J Gastroenterol*. 2008 Oct;103(10):2646-51.

Bosetti C, Lucenteforte E, Silverman DT, Petersen G, Bracci PM, Ji BT, Negri E, Li D, Risch HA, Olson SH, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Bamlet WR, Holly EA, Bertuccio P, Gao YT, Hassan M, Yu H, Kurtz RC, Cotterchio M, Su J, Maisonneuve P, Duell EJ, Boffetta P, La Vecchia C. Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann Oncol.* 2012 Jul;23(7):1880-8.

Bosetti C, Lucenteforte E, Bracci PM, Negri E, Neale RE, Risch HA, Olson SH, Gallinger S, Miller AB, Bueno-de-Mesquita HB, Talamini R, Polesel J, Ghadirian P, Baghurst PA, Zatonski W, Fontham E, Holly EA, Gao YT, Yu H, Kurtz RC, Cotterchio M, Maisonneuve P, Zeegers MP, Duell EJ, Boffetta P, La Vecchia C. Ulcer, gastric surgery and pancreatic cancer risk: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol.* 2013 Nov;24(11):2903-10.

Bouchardy C, Clavel F, La Vecchia C, Raymond L, Boyle P. Alcohol, beer and cancer of the pancreas. *Int J Cancer.* 1990 May 15;45(5):842-6.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Sep 12.

Brown JS, Banerji U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Ther.* 2016 Dec 3. pii: S0163-7258(16)30244-3.

Bueno de Mesquita HB, Maisonneuve P, Moerman CJ, Runia S, Boyle P. Lifetime consumption of alcoholic beverages, tea and coffee and exocrine carcinoma of the pancreas: a population-based case-control study in The Netherlands. *Int J Cancer.* 1992 Feb 20;50(4):514-22.

Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, Redston MS, Schutte M, Seymour AB, Weinstein CL, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):27-32.

Carpén JD, Faber AL, Horn C, Donoho GP, Briggs SL, Robbins CM, Hostetter G, Boguslawski S, Moses TY, Savage S, Uhlik M, Lin A, Du J, Qian YW, Zeckner DJ, Tucker-Kellogg G, Touchman J, Patel K, Mousses S, Bittner M, Schevitz R, Lai MH, Blanchard KL, Thomas JE. A transforming

mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):439-44.

Carrière A, Cargnello M, Julien LA, Gao H, Bonneil E, Thibault P, Roux PP. Oncogenic MAPK signaling stimulates mTORC1 activity by promoting RSK-mediated raptor phosphorylation. *Curr Biol*. 2008 Sep 9;18(17):1269-77.

Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*. 2011 Jan 7;286(1):567-77.

Chan WT, Verma CS, Lane DP, Gan SK. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep*. 2013 Dec 12;33(6).

Chandarlapaty S, Sawai A, Scaltriti M, Rodrik-Outmezguine V, Grbovic-Huezo O, Serra V, Majumder PK, Baselga J, Rosen N. AKT inhibition relieves feedback suppression of receptor tyrosine kinase expression and activity. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):58-71.

Chandel NS. Mitochondria as signaling organelles. *BMC Biol*. 2014 May 27;12:34.

Chen ML, Xu PZ, Peng XD, Chen WS, Guzman G, Yang X, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Hay N. The deficiency of Akt1 is sufficient to suppress tumor development in *Pten*^{+/-} mice. *Genes Dev*. 2006 Jun 15;20(12):1569-74.

Cheng G, Zielonka J, Ouari O, Lopez M, McAllister D, Boyle K, Barrios CS, Weber JJ, Johnson BD, Hardy M, Dwinell MB, Kalyanaraman B. Mitochondria-Targeted Analogues of Metformin Exhibit Enhanced Antiproliferative and Radiosensitizing Effects in Pancreatic Cancer Cells. *Cancer Res*. 2016 Jul 1;76(13):3904-15.

Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res*. 2007 Mar 1;67(5):1979-87.

Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR. AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases,

is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Oct 1;89(19):9267-71.

Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Apr 16;93(8):3636-41.

Cheong JH, Park ES, Liang J, Dennison JB, Tsavachidou D, Nguyen-Charles C, Wa Cheng K, Hall H, Zhang D, Lu Y, Ravoori M, Kundra V, Ajani J, Lee JS, Ki Hong W, Mills GB. Dual inhibition of tumor energy pathway by 2-deoxyglucose and metformin is effective against a broad spectrum of preclinical cancer models. *Mol Cancer Ther*. 2011 Dec;10(12):2350-62.

Chiaradonna F, Gaglio D, Vanoni M, Alberghina L. Expression of transforming K-Ras oncogene affects mitochondrial function and morphology in mouse fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep-Oct;1757(9-10):1338-56.

Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal*. 2009 Apr;21(4):470-6.

Chin YR, Yoshida T, Marusyk A, Beck AH, Polyak K, Toker A. Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2014 Feb 1;74(3):964-73.

Clavel F, Benhamou E, Auquier A, Tarayre M, Flamant R. Coffee, alcohol, smoking and cancer of the pancreas: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989 Jan 15;43(1):17-21.

Collins JJ, Esmen NA, Hall TA. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and pancreatic cancer. *Am J Ind Med*. 2001 Mar;39(3):336-45.

Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup. FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1817-25.

Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP Jr, Schabel FM Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the

pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* 1984 Feb;44(2):717-26.

Davies MA, Stemke-Hale K, Tellez C, Calderone TL, Deng W, Prieto VG, Lazar AJ, Gershenwald JE, Mills GB. A novel AKT3 mutation in melanoma tumours and cell lines. *Br J Cancer.* 2008 Oct 21;99(8):1265-8.

De Luca A, Fiorillo M, Peiris-Pagès M, Ozsvári B, Smith DL, Sanchez-Alvarez R, Martinez-Outschoorn UE, Cappello AR, Pezzi V, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondrial biogenesis is required for the anchorage-independent survival and propagation of stem-like cancer cells. *Oncotarget.* 2015 Jun 20;6(17):14777-95.

de Sousa e Melo F, Kurtova AV, Harnoss JM, Kljavin N, Hoeck JD, Hung J, Anderson JE, Storm EE, Modrusan Z, Koeppen H, Dijkgraaf GJ, Piskol R, de Sauvage FJ. A distinct role for Lgr5⁺ stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature.* 2017 Mar 29;543(7647):676-680.

DeBerardinis RJ, Mancuso A, Daikhin E, Nissim I, Yudkoff M, Wehrli S, Thompson CB. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 4;104(49):19345-50.

Decensi A, Puntoni M, Goodwin P, Cazzaniga M, Gennari A, Bonanni B, Gandini S. Metformin and cancer risk in diabetic patients: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila).* 2010 Nov;3(11):1451-61.

Deerenberg EB, Poley JW, Hermans JJ, Ganesh S, van der Harst E, van Eijck CH. Role of endoscopic ultrasonography in patients suspected of pancreatic cancer with negative helical MDCT scan. *Dig Surg.* 2011;28(5-6):398-403.

Dillon RL, Marcotte R, Hennessy BT, Woodgett JR, Mills GB, Muller WJ. Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res.* 2009 Jun 15;69(12):5057-64.

Distler M, Aust D, Weitz J, Pilarsky C, Grützmann R. Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *Biomed Res Int.* 2014;2014:474905.

Dong G, Mao Q, Xia W, Xu Y, Wang J, Xu L, Jiang F. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncol Lett.* 2016 Mar;11(3):1980-1986. Epub 2016 Jan 29.

Ducreux M, Cuhna AS, Caramella C, Hollebecque A, Burtin P, Goéré D, Seufferlein T, Haustermans K, Van Laethem JL, Conroy T, Arnold D; ESMO Guidelines Committee. Cancer of the pancreas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2015 Sep;26 Suppl 5:v56-68.

Duell EJ, Lucenteforte E, Olson SH, Bracci PM, Li D, Risch HA, Silverman DT, Ji BT, Gallinger S, Holly EA, Fontham EH, Maisonneuve P, Bueno-de-Mesquita HB, Ghadirian P, Kurtz RC, Ludwig E, Yu H, Lowenfels AB, Seminara D, Petersen GM, La Vecchia C, Boffetta P. Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann Oncol.* 2012 Nov;23(11):2964-70.

Easton RM, Cho H, Roovers K, Shineman DW, Mizrahi M, Forman MS, Lee VM, Szabolcs M, de Jong R, Oltersdorf T, Ludwig T, Efstratiadis A, Birnbaum MJ. Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size. *Mol Cell Biol.* 2005 Mar;25(5):1869-78.

Easwaran H, Tsai HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: tumor heterogeneity, plasticity of stem-like states, and drug resistance. *Mol Cell.* 2014 Jun 5;54(5):716-27.

El-Khoueiry AB, Ramanathan RK, Yang DY, Zhang W, Shibata S, Wright JJ, Gandara D, Lenz HJ. A randomized phase II of gemcitabine and sorafenib versus sorafenib alone in patients with metastatic pancreatic cancer. *Invest New Drugs.* 2012 Jun;30(3):1175-83.

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, Karnauskas R, Harris MH, Plas DR, Zhuang H, Cinalli RM, Alavi A, Rudin CM, Thompson CB. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res.* 2004 Jun 1;64(11):3892-9.

Escoll M, Gargini R, Cuadrado A, Anton IM, Wandosell F. Mutant p53 oncogenic functions in cancer stem cells are regulated by WIP through YAP/TAZ. *Oncogene.* 2017 Jun 22;36(25):3515-3527.

Escors D, Breckpot K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2010 Apr;58(2):107-19.

Everhart J, Wright D. Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis. *JAMA*. 1995 May 24-31;273(20):1605-9.

Farma JM, Santillan AA, Melis M, Walters J, Belinc D, Chen DT, Eikman EA, Malafa M. PET/CT fusion scan enhances CT staging in patients with pancreatic neoplasms. *Ann Surg Oncol*. 2008 Sep;15(9):2465-71.

Farnie G, Sotgia F, Lisanti MP. High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30472-86.

Faubert B, Boily G, Izreig S, Griss T, Samborska B, Dong Z, Dupuy F, Chambers C, Fuerth BJ, Viollet B, Mamer OA, Avizonis D, DeBerardinis RJ, Siegel PM, Jones RG. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell Metab*. 2013 Jan 8;17(1):113-24.

Fiorino S, Chili E, Bacchi-Reggiani L, Masetti M, Deleonardi G, Grondona AG, Silvestri T, Magrini E, Zanini N, Cuppini A, Nardi R, Jovine E. Association between hepatitis B or hepatitis C virus infection and risk of pancreatic adenocarcinoma development: a systematic review and meta-analysis. *Pancreatology*. 2013 Mar-Apr;13(2):147-60.

Fogal V, Richardson AD, Karmali PP, Scheffler IE, Smith JW, Ruoslahti E. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 2010 Mar;30(6):1303-18.

Franciosi M, Lucisano G, Lapice E, Strippoli GF, Pellegrini F, Nicolucci A. Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PLoS One*. 2013 Aug 2;8(8):e71583.

Freelove R, Walling AD. Pancreatic cancer: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 2006 Feb 1;73(3):485-92.

Frezza C, Zheng L, Folger O, Rajagopalan KN, MacKenzie ED, Jerby L, Micaroni M, Chaneton B, Adam J, Hedley A, Kalna G, Tomlinson IP, Pollard PJ, Watson DG, Deberardinis RJ, Shlomi T, Ruppin E, Gottlieb E. Haem oxygenase is synthetically lethal with the tumour suppressor fumarate hydratase. *Nature*. 2011 Aug 17;477(7363):225-8.

Froger A, Hall JE. Transformation of plasmid DNA into E. coli using the heat shock method. *J Vis Exp.* 2007;(6):253.

Gallus S, Turati F, Tavani A, Polesel J, Talamini R, Franceschi S, La Vecchia C. Soft drinks, sweetened beverages and risk of pancreatic cancer. *Cancer Causes Control.* 2011 Jan;22(1):33-9.

Gargini R, Cerliani JP, Escoll M, Antón IM, Wandosell F. Cancer stem cell-like phenotype and survival are coordinately regulated by Akt/FoxO/Bim pathway. *Stem Cells.* 2015 Mar;33(3):646-60.

Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, Ibañez-Vea M, Lorenzo L, Fernandez-Hinojal G, Vera R, Smerdou C, Martisova E, Arozarena I, Wellbrock C, Llopiz D, Ruiz M, Sarobe P, Breckpot K, Kochan G, Escors D. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep.* 2017 Aug 22;20(8):1818-1829.

Geer RJ, Brennan MF. Prognostic indicators for survival after resection of pancreatic adenocarcinoma. *Am J Surg.* 1993 Jan;165(1):68-72; discussion 72-3.

Genkinger JM, Spiegelman D, Anderson KE, Bergkvist L, Bernstein L, van den Brandt PA, English DR, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giles GG, Giovannucci E, Hankinson SE, Horn-Ross PL, Leitzmann M, Männistö S, Marshall JR, McCullough ML, Miller AB, Reding DJ, Robien K, Rohan TE, Schatzkin A, Stevens VL, Stolzenberg-Solomon RZ, Verhage BA, Wolk A, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Alcohol intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of fourteen cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Mar;18(3):765-76.

Genkinger JM, Li R, Spiegelman D, Anderson KE, Albanes D, Bergkvist L, Bernstein L, Black A, van den Brandt PA, English DR, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giles GG, Giovannucci E, Goldbohm RA, Horn-Ross PL, Jacobs EJ, Koushik A, Männistö S, Marshall JR, Miller AB, Patel AV, Robien K, Rohan TE, Schairer C, Stolzenberg-Solomon R, Wolk A, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Coffee, tea, and sugar-sweetened carbonated soft drink intake and pancreatic cancer risk: a pooled analysis of 14 cohort studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2012 Feb;21(2):305-18.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.

Gong Y, Zhou Q, Zhou Y, Lin Q, Zeng B, Chen R, Li Z. Gastrectomy and risk of pancreatic cancer: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control*. 2012 Aug;23(8):1279-88.

Gonçalves JM, Silva CAB, Rivero ERC, Cordeiro MMR. Inhibition of cancer stem cells promoted by Pimozide. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018 Nov 1.

Gou S, Cui P, Li X, Shi P, Liu T, Wang C. Low concentrations of metformin selectively inhibit CD133⁺ cell proliferation in pancreatic cancer and have anticancer action. *PLoS One*. 2013 May 8;8(5):e63969.

Grover S, Syngal S. Hereditary pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2010 Oct;139(4):1076-80, 1080.e1-2.

Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT. Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol*. 2008 Jan;28(2):718-31.

Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002 Jul 26;110(2):177-89.

Harrington LS, Findlay GM, Gray A, Tolkacheva T, Wigfield S, Rebholz H, Barnett J, Leslie NR, Cheng S, Shepherd PR, Gout I, Downes CP, Lamb RF. The TSC1-2 tumor suppressor controls insulin-PI3K signaling via regulation of IRS proteins. *J Cell Biol*. 2004 Jul 19;166(2):213-23. Epub 2004 Jul 12.

Heiler S, Wang Z, Zöller M. Pancreatic cancer stem cell markers and exosomes - the incentive push. *World J Gastroenterol*. 2016 Jul 14;22(26):5971-6007.

Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ, Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313-23.

Hermann PC, Trabulo SM, Sainz B Jr, Balic A, Garcia E, Hahn SA, Vandana M, Sahoo SK, Tunic

P, Bakker A, Hidalgo M, Heeschen C. Multimodal Treatment Eliminates Cancer Stem Cells and Leads to Long-Term Survival in Primary Human Pancreatic Cancer Tissue Xenografts. *PLoS One*. 2013 Jun 18;8(6):e66371.

Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W. Lactate: a metabolic key player in cancer. *Cancer Res*. 2011 Nov 15;71(22):6921-5.

Hollander MC, Maier CR, Hobbs EA, Ashmore AR, Linnoila RI, Dennis PA. Akt1 deletion prevents lung tumorigenesis by mutant K-ras. *Oncogene*. 2011 Apr 14;30(15):1812-21.

Hu B, Guo Y. Inhibition of mitochondrial translation as a therapeutic strategy for human ovarian cancer to overcome chemoresistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Feb 5;509(2):373-378.

Hu Y, Lu W, Chen G, Wang P, Chen Z, Zhou Y, Ogasawara M, Trachootham D, Feng L, Pelicano H, Chiao PJ, Keating MJ, Garcia-Manero G, Huang P. K-ras(G12V) transformation leads to mitochondrial dysfunction and a metabolic switch from oxidative phosphorylation to glycolysis. *Cell Res*. 2012 Feb;22(2):399-412.

Huang K, Fingar DC. Growing knowledge of the mTOR signaling network. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Dec;36:79-90.

Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ. Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res*. 2004 May 1;64(9):3171-8.

Huxley R, Ansary-Moghaddam A, Berrington de González A, Barzi F, Woodward M. Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br J Cancer*. 2005 Jun 6;92(11):2076-83.

Iodice S, Gandini S, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Tobacco and the risk of pancreatic cancer: a review and meta-analysis. *Langenbecks Arch Surg*. 2008 Jul;393(4):535-45.

Iriana S, Ahmed S, Gong J, Annamalai AA, Tuli R, Hendifar AE. Targeting mTOR in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2016 Apr 25;6:99.

Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS. Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 2005 Dec 19;171(6):1023-34.

Javle MM, Shroff RT, Xiong H, Varadhachary GA, Fogelman D, Reddy SA, Davis D, Zhang Y, Wolff RA, Abbruzzese JL. Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies. *BMC Cancer.* 2010 Jul 14;10:368.

Jiao L, Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Pfeiffer RM, Park Y, Freedman DM, Gail MH, Alavanja MC, Albanes D, Beane Freeman LE, Chow WH, Huang WY, Hayes RB, Hoppin JA, Ji BT, Leitzmann MF, Linet MS, Meinhold CL, Schairer C, Schatzkin A, Virtamo J, Weinstein SJ, Zheng W, Stolzenberg-Solomon RZ. Body mass index, effect modifiers, and risk of pancreatic cancer: a pooled study of seven prospective cohorts. *Cancer Causes Control.* 2010 Aug;21(8):1305-14.

Jiang S, Zou Z, Nie P, Wen R, Xiao Y, Tang J. Synergistic Effects between mTOR Complex 1/2 and Glycolysis Inhibitors in Non-Small-Cell Lung Carcinoma Cells. *PLoS One.* 2015 Jul 15;10(7):e0132880.

Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Kamiyama H, Jimeno A, Hong SM, Fu B, Lin MT, Calhoun ES, Kamiyama M, Walter K, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Hartigan J, Smith DR, Hidalgo M, Leach SD, Klein AP, Jaffee EM, Goggins M, Maitra A, Iacobuzio-Donahue C, Eshleman JR, Kern SE, Hruban RH, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science.* 2008 Sep 26;321(5897):1801-6.

Ju X, Katiyar S, Wang C, Liu M, Jiao X, Li S, Zhou J, Turner J, Lisanti MP, Russell RG, Mueller SC, Ojeifo J, Chen WS, Hay N, Pestell RG. Akt1 governs breast cancer progression in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 May 1;104(18):7438-43.

Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol Cell Biol.* 2010 Feb;30(4):908-21.

Kalender A, Selvaraj A, Kim SY, Gulati P, Brûlé S, Viollet B, Kemp BE, Bardeesy N, Dennis P, Schlager JJ, Marette A, Kozma SC, Thomas G. Metformin, independent of AMPK, inhibits

mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* 2010 May 5;11(5):390-401.

Kalyanaraman B, Cheng G, Hardy M, Ouari O, Sikora A, Zielonka J, Dwinell M. Mitochondria-targeted metformins: anti-tumour and redox signalling mechanisms. *Interface Focus.* 2017 Apr 6;7(2):20160109.

Kang MJ, Jang JY, Chang YR, Kwon W, Jung W, Kim SW. Revisiting the concept of lymph node metastases of pancreatic head cancer: number of metastatic lymph nodes and lymph node ratio according to N stage. *Ann Surg Oncol.* 2014 May;21(5):1545-51.

Kardideh B, Samimi Z, Norooznejhad F, Kiani S, Mansouri K. Autophagy, cancer and angiogenesis: where is the link? *Cell Biosci.* 2019 Aug 13;9:65.

Karwacz K, Bricogne C, MacDonald D, Arce F, Bennett CL, Collins M, Escors D. PD-L1 co-stimulation contributes to ligand-induced T cell receptor down-modulation on CD8+ T cells. *EMBO Mol Med.* 2011 Oct;3(10):581-92.

Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J.* 2001 Sep;15(11):1953-62.

Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006 Mar;3(3):177-85.

Kim SJ, DeStefano MA, Oh WJ, Wu CC, Vega-Cotto NM, Finlan M, Liu D, Su B, Jacinto E. mTOR complex 2 regulates proper turnover of insulin receptor substrate-1 via the ubiquitin ligase subunit Fbw8. *Mol Cell.* 2012 Dec 28;48(6):875-87.

Kindler HL, Wroblewski K, Wallace JA, Hall MJ, Locker G, Nattam S, Agamah E, Stadler WM, Vokes EE. Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: a phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Invest New Drugs.* 2012 Feb;30(1):382-6.

Kisfalvi K, Moro A, Sinnott-Smith J, Eibl G, Rozengurt E. Metformin inhibits the growth of human pancreatic cancer xenografts. *Pancreas.* 2013 Jul;42(5):781-5.

Koivunen P, Lee S, Duncan CG, Lopez G, Lu G, Ramkissoon S, Losman JA, Joensuu P, Bergmann U, Gross S, Travins J, Weiss S, Looper R, Ligon KL, Verhaak RG, Yan H, Kaelin WG Jr. Transformation by the (R)-enantiomer of 2-hydroxyglutarate linked to EGLN activation. *Nature*. 2012 Feb 15;483(7390):484-8.

Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer*. 2011 May;11(5):325-37.

Koushik A, Spiegelman D, Albanes D, Anderson KE, Bernstein L, van den Brandt PA, Bergkvist L, English DR, Freudenheim JL, Fuchs CS, Genkinger JM, Giles GG, Goldbohm RA, Horn-Ross PL, Männistö S, McCullough ML, Millen AE, Miller AB, Robien K, Rohan TE, Schatzkin A, Shikany JM, Stolzenberg-Solomon RZ, Willett WC, Wolk A, Ziegler RG, Smith-Warner SA. Intake of fruits and vegetables and risk of pancreatic cancer in a pooled analysis of 14 cohort studies. *Am J Epidemiol*. 2012 Sep 1;176(5):373-86.

Kuang J, Yan X, Genders AJ, Granata C, Bishop DJ. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One*. 2018 May 10;13(5):e0196438.

Lamb R, Harrison H, Hulit J, Smith DL, Lisanti MP, Sotgia F. Mitochondria as new therapeutic targets for eradicating cancer stem cells: Quantitative proteomics and functional validation via MCT1/2 inhibition. *Oncotarget*. 2014 Nov 30;5(22):11029-37.

Lamb R, Bonuccelli G, Ozsvári B, Peiris-Pagès M, Fiorillo M, Smith DL, Bevilacqua G, Mazzanti CM, McDonnell LA, Naccarato AG, Chiu M, Wynne L, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Mitochondrial mass, a new metabolic biomarker for stem-like cancer cells: Understanding WNT/FGF-driven anabolic signaling. *Oncotarget*. 2015 Oct 13;6(31):30453-71.

Lamb R, Ozsvari B, Lisanti CL, Tanowitz HB, Howell A, Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease. *Oncotarget*. 2015 Mar 10;6(7):4569-84.

Larsson SC, Giovannucci E, Bergkvist L, Wolk A. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006

Dec;15(12):2561-4.

Larsson SC, Orsini N, Wolk A. Body mass index and pancreatic cancer risk: A meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer*. 2007 May 1;120(9):1993-8.

Larsson SC, Wolk A. Red and processed meat consumption and risk of pancreatic cancer: meta-analysis of prospective studies. *Br J Cancer*. 2012 Jan 31;106(3):603-7.

Lathia JD, Liu H. Overview of Cancer Stem Cells and Stemness for Community Oncologists. *Target Oncol*. 2017 Aug;12(4):387-399.

Lei Y, Zhang D, Yu J, Dong H, Zhang J, Yang S. Targeting autophagy in cancer stem cells as an anticancer therapy. *Cancer Lett*. 2017 May 1;393:33-39.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

Li L, Wu B, Yang LB, Yin GC, Liu JY. Chronic hepatitis B virus infection and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(1):275-9.

Liechtenstein T, Perez-Janices N, Escors D. Lentiviral vectors for cancer immunotherapy and clinical applications. *Cancers (Basel)*. 2013 Sep;5(3):815-37.

Liechtenstein T, Perez-Janices N, Blanco-Luquin I, Goyvaerts C, Schwarze J, Dufait I, Lanna A, Ridder M, Guerrero-Setas D, Breckpot K, Escors D. Anti-melanoma vaccines engineered to simultaneously modulate cytokine priming and silence PD-L1 characterized using ex vivo myeloid-derived suppressor cells as a readout of therapeutic efficacy. *Oncoimmunology*. 2014 Jul 3;3(7):e945378. ECollection 2014.

Lin G, Zeng Z, Wang X, Wu Z, Wang J, Wang C, Sun Q, Chen Y, Quan H. Cholecystectomy and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of observational studies. *Cancer Causes Control*. 2012 Jan;23(1):59-67.

Lin HL, An QZ, Wang QZ, Liu CX. Folate intake and pancreatic cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis. *Public Health*. 2013 Jul;127(7):607-13.

Linnerth-Petrik NM, Santry LA, Petrik JJ, Wootton SK. Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *PLoS One*. 2014 Apr 10;9(4):e94595.

Liu H, Radisky DC, Nelson CM, Zhang H, Fata JE, Roth RA, Bissell MJ. Mechanism of Akt1 inhibition of breast cancer cell invasion reveals a protumorigenic role for TSC2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Mar 14;103(11):4134-9.

Liu SL, Zhao YP, Dai MH, You L, Wen Z, Xu JW. Vitamin D status and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(17):3356-9.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, *et al*. *Molecular Cell Biology*. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 16.2, Electron Transport and Oxidative Phosphorylation.

Löhr M, Klöppel G, Maisonneuve P, Lowenfels AB, Lüttges J. Frequency of K-ras mutations in pancreatic intraductal neoplasias associated with pancreatic ductal adenocarcinoma and chronic pancreatitis: a meta-analysis. *Neoplasia*. 2005 Jan;7(1):17-23.

Lonardo E, Cioffi M, Sancho P, Sanchez-Ripoll Y, Trabulo SM, Dorado J, Balic A, Hidalgo M, Heeschen C. Metformin targets the metabolic achilles heel of human pancreatic cancer stem cells. *PLoS One*. 2013 Oct 18;8(10):e76518.

Lu CW, Lin SC, Chen KF, Lai YY, Tsai SJ. Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J Biol Chem*. 2008 Oct 17;283(42):28106-14.

Luo G, Hao NB, Hu CJ, Yong X, Lü MH, Cheng BJ, Zhang Y, Yang SM. HBV infection increases the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Cancer Causes Control*. 2013 Mar;24(3):529-37.

Lynch SM, Vrieling A, Lubin JH, Kraft P, Mendelsohn JB, Hartge P, Canzian F, Steplowski E, Arslan AA, Gross M, Helzlsouer K, Jacobs EJ, LaCroix A, Petersen G, Zheng W, Albanes D, Amundadottir L, Bingham SA, Boffetta P, Boutron-Ruault MC, Chanock SJ, Clipp S, Hoover RN, Jacobs K, Johnson KC, Kooperberg C, Luo J, Messina C, Palli D, Patel AV, Riboli E, Shu XO, Rodriguez Suarez L, Thomas G, Tjønneland A, Tobias GS, Tong E, Trichopoulos D, Virtamo J, Ye W, Yu K, Zeleniuch-Jacquette A, Bueno-de-Mesquita HB, Stolzenberg-Solomon RZ. Cigarette smoking and pancreatic cancer: a pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium. *Am*

J Epidemiol. 2009 Aug 15;170(4):403-13.

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 Apr 22;121(2):179-93.

Maciorowski Z, Chattopadhyay PK, Jain P. Basic Multicolor Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017 Apr 3;117:5.4.1-5.4.38.

Maisonneuve P, Lowenfels AB. Risk factors for pancreatic cancer: a summary review of meta-analytical studies. *Int J Epidemiol*. 2015 Feb;44(1):186-98.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16;133(4):704-15.

Maroulakou IG, Oemler W, Naber SP, Tschlis PN. Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res*. 2007 Jan 1;67(1):167-77.

Matsuo K, Ito H, Wakai K, Nagata C, Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Tamakoshi A, Sasazuki S, Inoue M, Tsugane S; Research Group for the Development and Evaluation of Cancer Prevention Strategies in Japan. Cigarette smoking and pancreas cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence in the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*. 2011 Nov;41(11):1292-302.

Matthaei H, Schulick RD, Hruban RH, Maitra A. Cystic precursors to invasive pancreatic cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011 Mar;8(3):141-50.

Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*. 2018;14(8):1435-1455.

Mills LD, Zhang Y, Marler RJ, Herreros-Villanueva M, Zhang L, Almada LL, Couch F, Wetmore C, Pasca di Magliano M, Fernandez-Zapico ME. Loss of the transcription factor GLI1 identifies a signaling network in the tumor microenvironment mediating KRAS oncogene-induced transformation. *J Biol Chem*. 2013 Apr 26;288(17):11786-94.

Mohammed A, Janakiram NB, Brewer M, Ritchie RL, Marya A, Lightfoot S, Steele VE, Rao CV. Antidiabetic Drug Metformin Prevents Progression of Pancreatic Cancer by Targeting in Part Cancer Stem Cells and mTOR Signaling. *Transl Oncol*. 2013 Dec 1;6(6):649-59. eCollection 2013 Dec 1.

Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*. 2007 May 20;25(15):1960-6. Epub 2007 Apr 23.

Moore CB, Guthrie EH, Huang MT, Taxman DJ. Short hairpin RNA (shRNA): design, delivery, and assessment of gene knockdown. *Methods Mol Biol*. 2010;629:141-58.

Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2008 Aug 6;3(8):e2888.

Nakatani K, Thompson DA, Barthel A, Sakaue H, Liu W, Weigel RJ, Roth RA. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines. *J Biol Chem*. 1999 Jul 30;274(31):21528-32.

National Center for Health Statistics. *Health US, 2011: With Special Feature on Socioeconomic Status and Health*. Hyattsville, MD: 2012. [Accessed September 13, 2012].

Nawaz H, Fan CY, Kloke J, Khalid A, McGrath K, Landsittel D, Papachristou GI. Performance characteristics of endoscopic ultrasound in the staging of pancreatic cancer: a meta-analysis. *JOP*. 2013 Sep 10;14(5):484-97.

Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer*.

2012 Jan 12;12(2):133-43.

Ning X, Du Y, Ben Q, Huang L, He X, Gong Y, Gao J, Wu H, Man X, Jin J, Xu M, Li Z. Bulk pancreatic cancer cells can convert into cancer stem cells(CSCs) in vitro and 2 compounds can target these CSCs. *Cell Cycle*. 2016;15(3):403-12.

Notta F, Chan-Seng-Yue M, Lemire M, Li Y, Wilson GW, Connor AA, Denroche RE, Liang SB, Brown AM, Kim JC, Wang T, Simpson JT, Beck T, Borgida A, Buchner N, Chadwick D, Hafezi-Bakhtiari S, Dick JE, Heisler L, Hollingsworth MA, Ibrahimov E, Jang GH, Johns J, Jorgensen LG, Law C, Ludkovski O, Lungu I, Ng K, Pasternack D, Petersen GM, Shlush LI, Timms L, Tsao MS, Wilson JM, Yung CK, Zogopoulos G, Bartlett JM, Alexandrov LB, Real FX, Cleary SP, Roehrl MH, McPherson JD, Stein LD, Hudson TJ, Campbell PJ, Gallinger S. A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. *Nature*. 2016 Oct 20;538(7625):378-382.

O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer Res*. 2006 Feb 1;66(3):1500-8.

O'Rourke MA, Cantwell MM, Cardwell CR, Mulholland HG, Murray LJ. Can physical activity modulate pancreatic cancer risk? a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2010 Jun 15;126(12):2957-68.

Ojajärvi IA, Partanen TJ, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen TP, Kogevinas M, Porta M, Vainio HU, Weiderpass E, Wesseling CH. Occupational exposures and pancreatic cancer: a meta-analysis. *Occup Environ Med*. 2000 May;57(5):316-24.

Ojajärvi A, Partanen T, Ahlbom A, Boffetta P, Hakulinen T, Jourenkova N, Kauppinen T, Kogevinas M, Vainio H, Weiderpass E, Wesseling C. Risk of pancreatic cancer in workers exposed to chlorinated hydrocarbon solvents and related compounds: a meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2001 May 1;153(9):841-50.

Ojajärvi A, Partanen T, Ahlbom A, Hakulinen T, Kauppinen T, Weiderpass E, Wesseling C. Estimating the relative risk of pancreatic cancer associated with exposure agents in job title data in a hierarchical Bayesian meta-analysis. *Scand J Work Environ Health*. 2007 Oct;33(5):325-35.

Paluszkiwicz P, Smolińska K, Dębińska I, Turski WA. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. *Cancer Epidemiol.* 2012 Feb;36(1):60-7.

Partecke LI, Sendler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, Nguyen TD, Albers N, Speerforck S, Lerch MM, Heidecke CD, von Bernstorff W, Stier A. A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res.* 2011;47(2):98-107.

Pearce LR, Huang X, Boudeau J, Pawłowski R, Wullschleger S, Deak M, Ibrahim AF, Gurlay R, Magnuson MA, Alessi DR. Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J.* 2007 Aug 1;405(3):513-22.

Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN. K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and nonductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res.* 1994 Mar 15;54(6):1556-60.

Pelosi E, Castelli G, Testa U. Pancreatic Cancer: Molecular Characterization, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells. *Biomedicines.* 2017 Nov 18;5(4). pii: E65.

Permeth-Wey J, Egan KM. Family history is a significant risk factor for pancreatic cancer: results from a systematic review and meta-analysis. *Fam Cancer.* 2009;8(2):109-17.

Pernicova I, Korbonits M. Metformin--mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat Rev Endocrinol.* 2014 Mar;10(3):143-56.

Peterson TR, Laplante M, Thoreen CC, Sancak Y, Kang SA, Kuehl WM, Gray NS, Sabatini DM. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell.* 2009 May 29;137(5):873-86.

Picaud S, Kavanagh KL, Yue WW, Lee WH, Muller-Knapp S, Gileadi O, Sacchettini J, Oppermann U. Structural basis of fumarate hydratase deficiency. *J Inher Metab Dis.* 2011 Jun;34(3):671-6.

Puleston D. Detection of Mitochondrial Mass, Damage, and Reactive Oxygen Species by Flow Cytometry. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015 Sep 1;2015(9):pdb.prot086298.

Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 Jun;24(3):349-58.

Raulien N, Friedrich K, Strobel S, Rubner S, Baumann S, von Bergen M, Körner A, Krueger M, Rossol M, Wagner U. Fatty Acid Oxidation Compensates for Lipopolysaccharide-Induced Warburg Effect in Glucose-Deprived Monocytes. *Front Immunol.* 2017 May 29;8:609.

Rausch V, Liu L, Apel A, Rettig T, Gladkich J, Labsch S, Kallifatidis G, Kaczorowski A, Groth A, Gross W, Gebhard MM, Schemmer P, Werner J, Salnikov AV, Zentgraf H, Büchler MW, Herr I. Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *J Pathol.* 2012 Jul;227(3):325-35.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):105-11.

Rishi A, Goggins M, Wood LD, Hruban RH. Pathological and molecular evaluation of pancreatic neoplasms. *Semin Oncol.* 2015 Feb;42(1):28-39.

Roux PP, Ballif BA, Anjum R, Gygi SP, Blenis J. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Sep 14;101(37):13489-94. Epub 2004 Sep 1.

Roy HK, Olusola BF, Clemens DL, Karolski WJ, Ratashak A, Lynch HT, Smyrk TC. AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2002 Jan;23(1):201-5.

Sadeghi N, Abbruzzese JL, Yeung SC, Hassan M, Li D. Metformin use is associated with better survival of diabetic patients with pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2012 May 15;18(10):2905-12.

Saini N, Yang X. Metformin as an anti-cancer agent: actions and mechanisms targeting cancer stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2018 Feb 1;50(2):133-143.

Sancho P, Burgos-Ramos E, Tavera A, Bou Kheir T, Jagust P, Schoenhals M, Barneda D, Sellers K, Campos-Olivas R, Graña O, Viera CR, Yuneva M, Sainz B Jr, Heeschen C. MYC/PGC-1 α Balance

Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):590-605.

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 Jul 27;14(14):1296-302.

Schima W, Ba-Ssalamah A, Goetzinger P, Scharitzer M, Koelblinger C. State-of-the-art magnetic resonance imaging of pancreatic cancer. *Top Magn Reson Imaging.* 2007 Dec;18(6):421-9.

Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP. Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg.* 1999 Jul;189(1):1-7.

Shah OJ, Wang Z, Hunter T. Inappropriate activation of the TSC/Rheb/mTOR/S6K cassette induces IRS1/2 depletion, insulin resistance, and cell survival deficiencies. *Curr Biol.* 2004 Sep 21;14(18):1650-6.

Shimokawa M, Ohta Y, Nishikori S, Matano M, Takano A, Fujii M, Date S, Sugimoto S, Kanai T, Sato T. Visualization and targeting of LGR5⁺ human colon cancer stem cells. *Nature.* 2017 May 11;545(7653):187-192.

Sinha N, Mukhopadhyay S, Das DN, Panda PK, Bhutia SK. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. *Oral Oncol.* 2013 Sep;49(9):854-862.

Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. *PLoS One.* 2013;8(2):e57289.

Solomon S, Das S, Brand R, Whitcomb DC. Inherited pancreatic cancer syndromes. *Cancer J.* 2012 Nov-Dec;18(6):485-91.

Stahl JM, Sharma A, Cheung M, Zimmerman M, Cheng JQ, Bosenberg MW, Kester M, Sandirasegarane L, Robertson GP. Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res.* 2004 Oct 1;64(19):7002-10.

Stevens RJ, Roddam AW, Beral V. Pancreatic cancer in type 1 and young-onset diabetes: systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer*. 2007 Feb 12;96(3):507-9. Epub 2007 Jan 16.

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MM, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Grüning NM, Krüger A, Tauqeer Alam M, Keller MA, Breitenbach M, Brindle KM, Rabinowitz JD, Ralser M. The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 2015 Aug;90(3):927-63.

Sun M, Wang G, Paciga JE, Feldman RI, Yuan ZQ, Ma XL, Shelley SA, Jove R, Tsihchlis PN, Nicosia SV, Cheng JQ. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. *Am J Pathol*. 2001 Aug;159(2):431-7.

Tanno S, Tanno S, Mitsuuchi Y, Altomare DA, Xiao GH, Testa JR. AKT activation up-regulates insulin-like growth factor I receptor expression and promotes invasiveness of human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*. 2001 Jan 15;61(2):589-93.

Takahashi-Yanaga F, Sasaguri T. GSK-3beta regulates cyclin D1 expression: a new target for chemotherapy. *Cell Signal*. 2008 Apr;20(4):581-9.

Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, Sohn T, Wilentz RE, Offerhaus GJ, Adsay V, Abrams RA, Cameron JL, Kern SE, Yeo CJ, Hruban RH, Goggins M. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):4115-21.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009 Nov 25;139(5):871-90.

Thomson S, Petti F, Sujka-Kwok I, Mercado P, Bean J, Monaghan M, Seymour SL, Argast GM, Epstein DM, Haley JD. A systems view of epithelial-mesenchymal transition signaling states. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Feb;28(2):137-55.

Tomita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*. 2016 Mar 8;7(10):11018-32.

Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012.

CA Cancer J Clin. 2015 Mar;65(2):87-108.

Tramacere I, Scotti L, Jenab M, Bagnardi V, Bellocco R, Rota M, Corrao G, Bravi F, Boffetta P, La Vecchia C. Alcohol drinking and pancreatic cancer risk: a meta-analysis of the dose-risk relation. *Int J Cancer*. 2010 Mar 15;126(6):1474-86.

Trede M, Schwall G, Saeger HD. Survival after pancreatoduodenectomy. 118 consecutive resections without an operative mortality. *Ann Surg*. 1990 Apr;211(4):447-58.

Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature*. 2012 Feb 15;483(7390):479-83.

Türker Şener L, Albeniz G, Dinç B, Albeniz I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med*. 2017 Sep;14(3):1866-1870.

Vachiranubhap B, Kim YH, Balci NC, Semelka RC. Magnetic resonance imaging of adenocarcinoma of the pancreas. *Top Magn Reson Imaging*. 2009 Feb;20(1):3-9.

van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, Offerhaus GJ, Hicks JL, Wilentz RE, Goggins MG, De Marzo AM, Hruban RH, Maitra A. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol*. 2002 Nov;161(5):1541-7.

Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 May 22;324(5930):1029-33.

Varadarajulu S, Wallace MB. Applications of endoscopic ultrasonography in pancreatic cancer. *Cancer Control*. 2004 Jan-Feb;11(1):15-22.

Viale A, Pettazoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sánchez N, Marchesini M, Carugo A, Green T, Seth S, Giuliani V, Kost-Alimova M, Muller F, Colla S, Nezi L, Genovese G, Deem AK, Kapoor A, Yao W, Brunetto E, Kang Y, Yuan M, Asara JM, Wang YA, Heffernan TP, Kimmelman AC, Wang H, Fleming JB, Cantley LC, DePinho RA, Draetta GF. Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature*. 2014 Oct 30;514(7524):628-32.

Virtakoivu R, Pellinen T, Rantala JK, Perälä M, Ivaska J. Distinct roles of AKT isoforms in regulating β 1-integrin activity, migration, and invasion in prostate cancer. *Mol Biol Cell*. 2012 Sep;23(17):3357-69.

Von Hoff DD, Ervin T, Arena FP, Chiorean EG, Infante J, Moore M, Seay T, Tjulandin SA, Ma WW, Saleh MN, Harris M, Reni M, Dowden S, Laheru D, Bahary N, Ramanathan RK, Tabernero J, Hidalgo M, Goldstein D, Van Cutsem E, Wei X, Iglesias J, Renschler MF. Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *N Engl J Med*. 2013 Oct 31;369(18):1691-703.

Wallace DC. Mitochondria and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012 Oct;12(10):685-98.

Wang Y, Zhang Y, Yang J, Ni X, Liu S, Li Z, Hodges SE, Fisher WE, Brunicardi FC, Gibbs RA, Gingras MC, Li M. Genomic sequencing of key genes in mouse pancreatic cancer cells. *Curr Mol Med*. 2012 Mar;12(3):331-41.

Wang Y, Yang S, Song F, Cao S, Yin X, Xie J, Tu X, Xu J, Xu X, Dong X, Lu Z. Hepatitis B virus status and the risk of pancreatic cancer: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2013 Jul;22(4):328-34.

Wang-Gillam A, Li CP, Bodoky G, Dean A, Shan YS, Jameson G, Macarulla T, Lee KH, Cunningham D, Blanc JF, Hubner RA, Chiu CF, Schwartzmann G, Siveke JT, Braiteh F, Moyo V, Belanger B, Dhindsa N, Bayever E, Von Hoff DD, Chen LT; NAPOLI-1 Study Group. Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): a global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016 Feb 6;387(10018):545-57.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956 Feb 24;123(3191):309-14.

Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell*. 2010 Mar 16;17(3):225-34.

Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate. *Cancer Cell*. 2012 Mar 20;21(3):297-308.

Wei F, Liu Y, Bellail AC, Olson JJ, Sun SY, Lu G, Ding L, Yuan C, Wang G, Hao C. K-Ras mutation-mediated IGF-1-induced feedback ERK activation contributes to the rapalog resistance in pancreatic ductal adenocarcinomas. *Cancer Lett.* 2012 Sep 1;322(1):58-69.

Weinberg F, Hamanaka R, Wheaton WW, Weinberg S, Joseph J, Lopez M, Kalyanaraman B, Mutlu GM, Budinger GR, Chandel NS. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 May 11;107(19):8788-93.

Weinberg SE, Chandel NS. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol.* 2015 Jan;11(1):9-15.

Wise DR, DeBerardinis RJ, Mancuso A, Sayed N, Zhang XY, Pfeiffer HK, Nissim I, Daikhin E, Yudkoff M, McMahon SB, Thompson CB. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 2;105(48):18782-7.

Wiza C, Nascimento EB, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2012 Jun 15;302(12):E1453-60.

Wolpin BM, Hezel AF, Abrams T, Blaszkiwsky LS, Meyerhardt JA, Chan JA, Enzinger PC, Allen B, Clark JW, Ryan DP, Fuchs CS. Oral mTOR inhibitor everolimus in patients with gemcitabine-refractory metastatic pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2009 Jan 10;27(2):193-8.

Xiao B, Deng X, Zhou W, Tan EK. Flow Cytometry-Based Assessment of Mitophagy Using MitoTracker. *Front Cell Neurosci.* 2016 Mar 30;10:76.

Xu JH, Fu JJ, Wang XL, Zhu JY, Ye XH, Chen SD. Hepatitis B or C viral infection and risk of pancreatic cancer: a meta-analysis of observational studies. *World J Gastroenterol.* 2013 Jul 14;19(26):4234-41.

Xu PZ, Chen ML, Jeon SM, Peng XD, Hay N. The effect Akt2 deletion on tumor development in Pten(+/-) mice. *Oncogene.* 2012 Jan 26;31(4):518-26.

Yadav D, Lowenfels AB. The epidemiology of pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013 Jun;144(6):1252-61.

Yang A, Qin S, Schulte BA, Ethier SP, Tew KD, Wang GY. MYC Inhibition Depletes Cancer Stem-like Cells in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* 2017 Dec 1;77(23):6641-6650.

Yang Q, Inoki K, Ikenoue T, Guan KL. Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity. *Genes Dev.* 2006 Oct 15;20(20):2820-32.

Yeo CJ, Cameron JL, Lillemoe KD, Sitzmann JV, Hruban RH, Goodman SN, Dooley WC, Coleman J, Pitt HA. Pancreaticoduodenectomy for cancer of the head of the pancreas. 201 patients. *Ann Surg.* 1995 Jun;221(6):721-31; discussion 731-3.

Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A. Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell.* 2005 Nov 23;20(4):539-50.

Yu Y, Yoon SO, Poulgiannis G, Yang Q, Ma XM, Villén J, Kubica N, Hoffman GR, Cantley LC, Gygi SP, Blenis J. Phosphoproteomic analysis identifies Grb10 as an mTORC1 substrate that negatively regulates insulin signaling. *Science.* 2011 Jun 10;332(6035):1322-6.

Zamboni G, Hirabayashi K, Castelli P, Lennon AM. Precancerous lesions of the pancreas. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013 Apr;27(2):299-322.

Zhang D, Zhao Q, Sun H, Yin L, Wu J, Xu J, He T, Yang C, Liang C. Defective autophagy leads to the suppression of stem-like features of CD271⁺ osteosarcoma cells. *J Biomed Sci.* 2016 Nov 18;23(1):82.

Zhang L, Gjoerup O, Roberts TM. The serine/threonine kinase cyclin G-associated kinase regulates epidermal growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jul 13;101(28):10296-301.

Zhang P, Li H, Tan X, Chen L, Wang S. Association of metformin use with cancer incidence and mortality: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2013 Jun;37(3):207-18.

Zhang S, Wang X, Osunkoya AO, Iqbal S, Wang Y, Chen Z, Müller S, Chen Z, Josson S, Coleman IM, Nelson PS, Wang YA, Wang R, Shin DM, Marshall FF, Kucuk O, Chung LW, Zhou HE, Wu D. EPLIN downregulation promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene.* 2011 Dec 15;30(50):4941-52.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, Lim M, Hilton DA, Zagzag D, Buechler P, Isaacs WB, Semenza GL, Simons JW. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.* 1999 Nov 15;59(22):5830-5.

Zhu H, Wang D, Liu Y, Su Z, Zhang L, Chen F, Zhou Y, Wu Y, Yu M, Zhang Z, Shao G. Role of the Hypoxia-inducible factor-1 alpha induced autophagy in the conversion of non-stem pancreatic cancer cells into CD133+ pancreatic cancer stem-like cells. *Cancer Cell Int.* 2013 Dec 5;13(1):119.