



Universidad
de Alcalá

Doctorado en Señalización Celular

Mecanismos de señalización que intervienen en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata. Papel de la autofagia y del cannabinoide WIN 55 212-2.

MARÍA CECILIA MORELL

Directores:

Dra. Nieves Rodríguez Henche

Dra. Inés Díaz-Laviada Marturet

Alcalá de Henares, 2016

Nieves Rodríguez Henche e Inés Díaz-Laviada Marturet, Profesor Titular de Universidad y Catedrático de Universidad respectivamente, del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

INFORMAN:

Que el trabajo titulado **“Mecanismos de señalización que intervienen en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata. Papel de la autofagia y del cannabinoide WIN 55 212-2”** ha sido realizado por **Dña. María Cecilia Morell** bajo su dirección y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 27 de septiembre de 2016

Antonio Jiménez Ruiz, Director del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá,

INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Mecanismos de señalización que intervienen en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata. Papel de la autofagia y del cannabinoide WIN 55 212-2”** ha sido realizado por **María Cecilia Morell** en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá bajo la dirección de las Dras. Nieves Rodríguez Henche e Inés Díaz-Laviada Marturet y, a su juicio, cumple todos los requisitos necesarios para que la interesada opte al Grado de Doctor.

Alcalá de Henares, 27 de septiembre de 2016

FINANCIACIÓN

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación de los siguientes proyectos de investigación por diferentes organismos públicos y privados:

Título del proyecto: “Efecto de los fitoquímicos derivados de las especies del género *Capsicum* sobre el metabolismo de células normales y tumorales. Papel de AMPK”. Entidad financiadora: Ministerio de Economía y Competitividad. Duración: 2013-2016. Investigador principal: Inés Díaz-Laviada Marturet.

Título del proyecto: “Abuso de ingredientes picantes en la alimentación en relación al cáncer de próstata. Efectos del principio activo Capsaicina sobre células tumorales de próstata”. Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Duración: 2014-2016. Investigador principal: Inés Díaz-Laviada Marturet.

Título del proyecto: “Estudio de la actividad antitumoral de diferentes fitoquímicos en el cáncer de próstata y el cáncer hepatocelular. Papel del metabolismo celular”. Entidad financiadora: Fundación Tatiana Perez de Guzmán El Bueno. Duración: 2013-2016. Investigador principal: Inés Díaz-Laviada Marturet.

Título del proyecto: “Evaluación de la terapia con cannabinoides y capsaicina en el crecimiento y la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata. Estudio *in vitro* e *in vivo*”. Entidad financiadora: Universidad de Alcalá. Duración: 2013-2014. Investigador principal: Nieves Rodríguez Henche.

Título del proyecto: “Acción de componentes naturales sobre la proliferación y secreción de citoquinas en células tumorales de próstata”. Entidad financiadora: Comunidad Castilla-La Mancha, PII1/09-0165-0822. Duración: 2009-2011. Investigador principal: Inés Díaz-Laviada Marturet.

Título del proyecto: “Estudio del estrés de retículo (ER) y de la autofagia en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata. Acción de los cannabinoides”. Entidad financiadora: CAM, CCG10-UAH/SAL-5956. Duración: 2011. Investigador principal: Nieves Rodríguez Henche.

Título del proyecto: “Aplicación de la tecnología de los arrays de expresión al estudio de la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata”. Entidad financiadora: UAH Ref. 2005/00088/001. Duración: 2005-2007. Investigador principal: Nieves Rodríguez Henche.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a mis Directoras de Tesis, las Doctoras Inés Díaz-Laviada Marturet y Nieves Rodríguez Henche, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo mi tesis doctoral en su grupo de investigación. Gracias por la paciencia infinita, la voluntad de enseñarme y por demostrarme que siempre se llega al final de la meta con esfuerzo y perseverancia.

A la Universidad de Alcalá y al Departamento de Biología de Sistemas, por permitirme realizar aquí la Tesis Doctoral. Agradezco a todo el personal del Departamento de Bioquímica, así como de los Centros de Apoyo de la Universidad de Alcalá el apoyo prestado durante todos estos años. Gracias a Angélica, por facilitarme siempre y con una disposición enorme todos los trámites burocráticos. A Juan y Guillermo, por su ayuda y disposición. A Isabel y Cristina, que además de la ayuda técnica, siempre estaban allí para dar ánimo cuando me vieron flaquear.

A mis compañeros de laboratorio, que sin ellos nada de todo esto hubiera sido posible. Quiero tener palabras de agradecimiento especiales para Diana. Por haberme ayudado a comenzar este trabajo, porque siempre confió en mí, porque fue generosa con todos sus conocimientos y nunca dudó en compartírmelos conmigo ni con ninguno de todos los que le rodeamos en este largo camino. Gracias por todo Diana!!! Y por supuesto, el mismo e infinito agradecimiento para mis compañeras y amigas Alicia y Ágata. A ellas dos les debo mil alegrías, algunos enfados, pero sobre todo les debo haberme sentido querida incondicionalmente. Soy muy afortunada por haber compartido con ellas el trabajo de laboratorio y me alegra saber que con su esfuerzo y dedicación aportan permanentemente a su engrandecimiento.

A mis amigos Eva, Nadia y Hector, gracias por la amistad, la compañía y la solidaridad. Soy muy feliz de haberlos conocido y tenerlos entre mis cariños me reconforta enormemente. Gracias por todo!

También agradecer a todos los compañeros del Departamento, han sido tantos! Gracias por hacerme sentir una más desde el comienzo, por escucharme en los momentos de tristeza y por compartir las alegrías que por suerte han sido muchas. De todos he aprendido algo. Gracias a Nuria por su calma y serenidad, su incansable trabajo y su perseverancia, un ejemplo a seguir para mí. Gracias a Laura y Eva, del laboratorio del Dr. Prieto, siempre dispuestas, generosas, alegres y alentadoras. A Patricia, Borja, David, Luisito y Arantxa siempre ocurrentes y divertidos.

Por último, pero no menos importante, agradecer a mi familia. A mi marido Lisandro y a mi hija Elena. Gracias mis amores por soportarme y darme el apoyo que me hizo falta para llegar hasta el final en este proyecto. Gracias a mi Mamá y mis hermanos, que aunque estando lejos, han estado a mi lado en mi corazón. Gracias familia, esto es lo que soy y todo es gracias a ustedes.

A Lisandro y Elena.... Mis amores
A mi Mamá y mis hermanos.....Mis raíces

**“Lo que sabemos es una
gota de agua; lo que
ignoramos es el océano. “**

Isaac Newton

ABREVIATURAS

- 2-AG** 2-Araquidonil-glicerol
- 2-AGE** 2-Araquidonil-gliceril éter o Noladina
- 3-MA** 3-Metiladenina
- AA** Ácido araquidónico
- AC** Adenilil ciclasa
- ACC** Acetil-CoA carboxilasa
- ADN** Ácido desoxirribonucleico
- ADNc** Ácido desoxirribonucleico complementario
- ADT** Terapia de eliminación de andrógenos
- AEA** N-Araquidoniletanolamida o Anandamida
- AICAR** 5-Aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido
- Akt inh IV** Inhibidor de Akt IV
- AMCAR** α -Metilacil-CoA racemasa
- AMP** Adenosín monofosfato
- AMPc** Adenosín monofosfato cíclico
- AMPK** Quinasa dependiente de AMP
- ATCC** *American Type Culture Collection*
- ATG** Genes relacionados con la autofagia
- ATP** Adenosín trifosfato
- BafA1** Bafilomicina A1
- BCP** 1-Bromo-3-cloropropano
- BPH** Hiperplasia benigna prostática
- β III Tub** β III-tubulina
- C.V.** Coeficiente de variación
- CAM** Molécula de adhesión celular
- CaMKK** Quinasa de la quinasa dependiente de calcio-calmodulina
- CB1** Receptor de cannabinoides tipo 1
- CB2** Receptor de cannabinoides tipo 2
- CBC** Cannabicromeno
- CBD** Cannabidiol
- CBDA** Ácido cannabidiólico
- CBG** Cannabigerol
- CBN** Cannabinol

Abreviaturas

- CBS** Cistationina β sintasa
- CMA** Autofagia mediada por chaperonas
- CP** Cáncer de próstata
- CPRC** Cáncer de próstata resistente a la castración
- ChREBP** Proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos
- D.E.** Desviación estándar
- DAG** Diacilglicerol
- DAGK** Diacilglicerol quinasa
- DAGL** Diacilglicerol lipasa
- DAPI** 4', 6'-diamidino-2-fenilindol
- DMSO** Dimetil sulfóxido
- EDTA** Ácido etilendiaminotetraacético
- EGF** Factor de crecimiento epidérmico
- EGFR** Receptor del factor de crecimiento epidérmico
- EGTA** Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetil éter)-tetraacético
- ELISA** *Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*
- ENO** Gen de enolasa
- ERK** Quinasa regulada por señales extracelulares
- FAK** Quinasa de adhesión focal
- FBS** Suero bovino fetal
- GAPDH** Gliceraldeído fosfato deshidrogenasa
- GPCR** Receptor acoplado a proteína G
- GRP** Péptido liberador de gastrina
- HMGR** 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- IL-6** Interleuquina 6
- LAMP2** Proteína asociada a membrana lisosomal 2
- LH** Hormona luteinizante
- LHRH** Hormona liberadora de hormona luteinizante
- LKB1** Quinasa hepática B1
- MAPK** Proteína quinasa activada por mitógenos
- MET** Metanandamida
- MO25** Proteína de ratón 25
- mTOR** Proteína diana de rampamicina en los mamíferos
- NE** Células neuroendocrinas

NED	Diferenciación neuroendocrina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NSE	Enolasa específica de neuronas
O-AEA	O-Araquidonil-etanolamina
PACp	Fosfatasa ácida prostática
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Tampón fosfato salino
PCD	Muerte celular programada
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PK1	Quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1
PEA	N-palmitoiletanolamina
PI	Fosfatidilinositol
PI3K	Fosfatidil inositol 3-quinasa
PIA	Atrofia proliferativa inflamatoria
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
PIP	Fosfatidilinositol 3-fosfato
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
PIP₃	Fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato
PKB	Proteína quinasa B
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Antígeno prostático específico
P70S6K	Quinasa ribosomal S6
PTEN	Homólogo de fosfatasa y tensina
PTHrP	Péptido relacionado con la hormona paratiroidea
RAPA	Rapamicina
RTK	Receptor tirosín quinasa
SBL	Tampón de muestra Laemmli
SDS	Dodecilsulfato sódico
SF	Sin suero
siARN	ARN de interferencia
SR1	SR-141716
SR2	SR-144528

Abreviaturas

SREBP Proteína de unión al elemento regulador de esteroides

STI Inhibidor de tripsina de soja

STRAD Adaptador relacionado con STE20

TBS Tampón Tris salino

THCA Ácido delta-Tetrahidrocannabinólico

THC Delta-Tetrahidrocannabinol

THCV Delta-Tetrahidrocannabinivarin

TMB 3, 3',5,5'-tetrametilbenzidina

Tris 2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol

TRPV Canal activado por potencial transitorio tipo vanilloide

Vps34 Fosfatidilinositol 3 quinasa de clase III

WIN R-(+)-WIN 55 212-2

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Anatomía e histología de la próstata normal	1
2. Patologías de la próstata	2
2.1. Hiperplasia benigna prostática	2
2.2. Estados premalignos	3
2.3. Cáncer	4
2.3.1. Incidencia	4
2.3.2. Etiopatogenia	4
2.3.3. Estratificación	5
2.3.4. Tratamiento	5
3. Diferenciación neuroendocrina en el cáncer de próstata	7
3.1. Células neuroendocrinas en la próstata normal	7
3.2. Células neuroendocrinas en el cáncer de próstata	8
4. Autofagia	11
4.1. Tipos de muerte celular programada	11
4.2. Tipos de autofagia	12
4.2.1. Macroautofagia	14
4.2.2. Autofagia mediada por chaperonas	20
4.2.3. Microautofagia	21
5. Mecanismos de señalización relacionados con la supervivencia celular en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata	22
5.1. Vía PI3K/Akt	22
5.2. Quinasa dependiente de AMP	27
6. Cannabinoides	30
6.1. Sistema endocannabinoide	30
6.2. Ligandos cannabinoides	30
6.2.1. Endocannabinoides	31
6.2.2. Fitocannabinoides	31
6.2.3. Cannabinoides sintéticos	31
6.3. Receptores de cannabinoides	33
6.4. Cannabinoides y cáncer	34
6.5. Cannabinoides y cáncer de próstata	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	37
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Materiales y reactivos	43
1.1. Materiales empleados en cultivos celulares	43
1.2. Reactivos empleados en la elaboración de tampones.....	43
1.3. Agonistas, antagonistas, activadores e inhibidores.....	43

2. Métodos	44
2.1. Cultivos celulares	44
2.2. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico	44
2.3. Obtención de extractos celulares	45
2.4. Separación de fracción particulada y soluble de células en cultivo	45
2.5. Cuantificación de proteínas.....	45
2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de proteínas.....	46
2.7. Inmunocitoquímica	48
2.8. Silenciamiento con ARN de interferencia	48
2.9. Aislamiento de ARN	49
2.10. Retrotranscripción de ARN	50
2.11. PCR cuantitativa a tiempo real	50
2.12. Determinación de niveles de IL-6	51
2.13. Experimentación animal.....	52
2.13.1. Animales	52
2.13.2. Inducción de tumores	52
2.14. Análisis estadístico	52
 RESULTADOS	 53
 1. Modelo celular de diferenciación neuroendocrina mediante retirada de suero del medio de cultivo.....	 55
 2. Estudio de los niveles de interleuquina-6 en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP	 61
 3. Estudio de los efectos de las células neuroendocrinas sobre el crecimiento y capacidad tumoral de células resistentes a andrógenos	 62
3.1. Efecto mitogénico de las células neuroendocrinas sobre el crecimiento de células de cáncer de próstata PC-3.....	62
3.2. El efecto mitogénico de los sobrenadantes de células neuroendocrinas no está mediado por IL-6	62
3.3. Efecto de células NE sobre el crecimiento tumoral de células PC-3.....	65
 4. Estudio de la señalización celular en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP	 66
4.1. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.	66
4.2. Quinasa dependiente de AMP	71
4.3. La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR produce activación de AMPK	74
 5. Estudio de la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP	 76
5.1. Activación de la autofagia durante la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP	76
5.2. Aumento de la expresión de LAMP2 durante la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP	80
5.3. Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP	84
5.4. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre la autofagia	87
5.5. Efecto de la inhibición de LAMP2 sobre la autofagia	91

5.6. Efecto de la activación de AMPK sobre la autofagia.....	93
6. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN)	95
6.1. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en células LNCaP y células neuroendocrinas.....	95
6.2. El cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) disminuye la viabilidad de células LNCaP y de células neuroendocrinas.....	97
6.3. El cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) disminuye la expresión de marcadores neuroendocrinos.....	97
6.4. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y AMPK en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.....	100
6.5. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la secreción de IL-6 en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP	103
6.6. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) en el crecimiento de tumores con presencia de células NE	106
6.7. Efecto de WIN 55,212-2 (WIN) en células PC-3 utilizadas como modelo celular de diferenciación neuroendocrina	108
DISCUSIÓN.....	113
1. Modelo celular de diferenciación neuroendocrina y crecimiento celular.....	116
2. Estudio de la señalización celular en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP.....	119
2.1 Papel de la vía de señalización PI3K/Akt	119
2.2 Papel de la quinasa dependiente de AMP	120
3. Estudio de la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP	122
4. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y papel de WIN 55,212-2 (WIN) en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP.....	127
4.1 Receptores CB1 y CB2	127
4.2 Niveles de interleuquina-6	128
4.3 Señalización celular	129
4.4 Efecto antitumoral	129
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA.....	137
ANEXO I: SUMMARY	163
ANEXO II: PUBLICACIONES	169

INTRODUCCIÓN

1. Anatomía e histología de la próstata normal

La próstata es la glándula accesoria de mayor tamaño del aparato reproductor masculino. Mide 3 cm en el eje vertical, 2 cm en el eje antero posterior y 4 cm en el eje transversal. Su peso normal es de unos 20 gramos. Se encuentra situada debajo de la vejiga urinaria y rodeando a la uretra prostática. Este órgano crece lentamente desde el nacimiento hasta la pubertad, luego se expande rápidamente hasta los 30 años y a partir de esa edad permanece estable hasta los 45 años. Su función es segregar un líquido lechoso ligeramente alcalino que contiene una gran variedad de sustancias como ácido cítrico, o enzimas proteolíticas como antígeno prostático-específico (*Prostate Specific Antigen*, PSA), pepsinógeno, lisozima, amilasa, hidrolasa, fosfatasa ácida prostática (PACP) y seminoplastina. La secreción prostática forma parte del semen y protege a los espermatozoides ya que neutraliza el pH ácido de la vagina y así contribuye a la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Campbell, 2004).

La próstata está dividida en tres zonas: la zona central, la zona de transición y la zona periférica (McNeal 1968). Estas zonas tienen diferente origen embriológico y pueden ser distinguidas a través de sus características anatómicas e histológicas, sus distintas funciones y su susceptibilidad a desarrollar patologías (Lee et al. 2011; Packer & Maitland 2016).

El epitelio prostático está altamente organizado en dos capas contiguas de células con características histológicas diferentes: una capa luminal de células columnares y una capa basal de células cuboides. Además de las células basales y las células lumbinales, existe un tercer tipo de células epiteliales denominadas células neuroendocrinas (NE) que se encuentran esparcidas por el epitelio. También, se ha descrito la existencia de un cuarto tipo de célula llamadas células intermedias que poseen características de células basales y lumbinales (van Leenders et al. 2000). El epitelio se encuentra rodeado por el estroma que está constituido por células nerviosas, fibroblastos, linfocitos, macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas y tiene como función dar sostén y mantenimiento al epitelio glandular (Long et al. 2005; Taylor et al. 2010) (Figura 1).

La capa de células lumbinales representa el compartimento secretor del epitelio prostático, ya que sus células sintetizan y secretan las sustancias que se vuelcan al líquido prostático. Expresan receptor de andrógenos (*Androgen Receptor*, AR) y requieren de estos para su supervivencia (Long et al. 2005; Taylor et al. 2010).

Las células basales conforman el compartimento proliferativo del epitelio prostático. No expresan AR y son independientes de estos esteroides para su crecimiento (Long et al. 2005; Taylor et al. 2010).

Las células NE no son proliferativas, son altamente diferenciadas, no expresan AR y no requieren de estos para su supervivencia (McNeal 1988; Isaacs & Coffey 1989; Bonkhoff & Remberger 1996; Hudson et al. 2000).

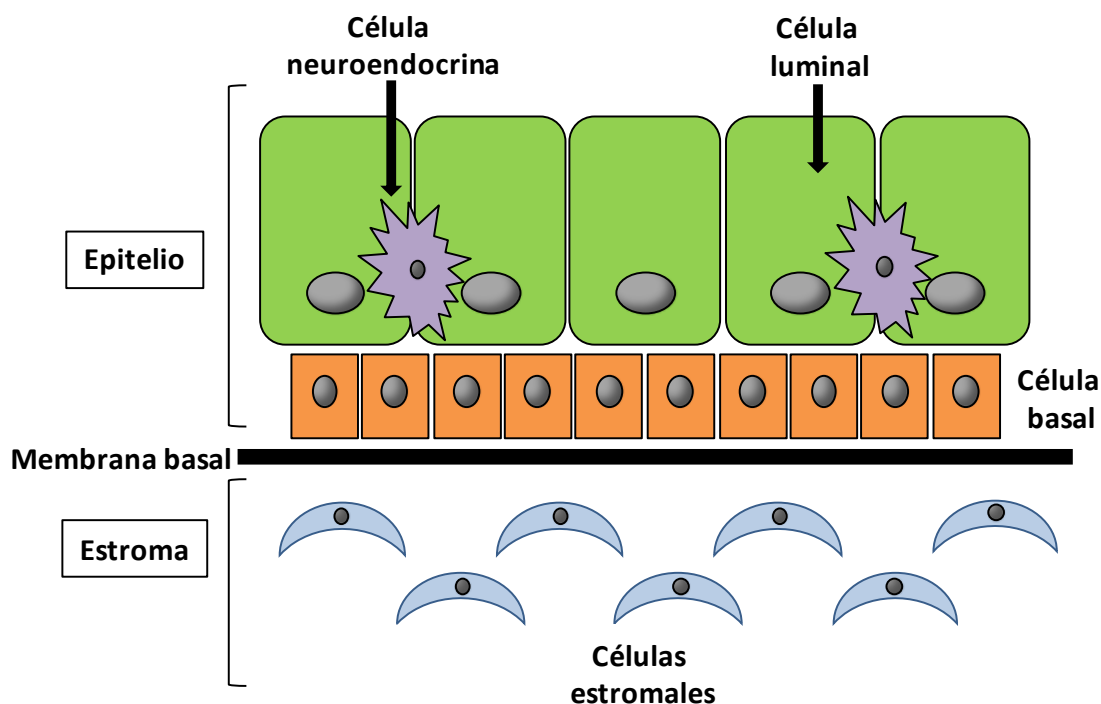


Figura 1. Estructura histológica de la próstata.

2. Patologías de la próstata

Las enfermedades de la próstata tienen un profundo impacto en la salud de la población masculina. Se distinguen varios estados patológicos relacionados con procesos inflamatorios y alteraciones en el crecimiento.

2.1. Hiperplasia benigna prostática (BPH)

La hiperplasia benigna prostática (**BPH**) es el crecimiento crónico, no maligno, del tejido prostático que rodea a la uretra que produce, en última instancia, un estreñimiento de la misma. Suele producirse en la zona de transición de la próstata. Debido a esto se asocia con los denominados síntomas del tracto urinario bajo como son la urgencia y frecuencia al orinar, nicturia, vaciamiento incompleto de la vejiga y chorro miccional débil. Es una patología prostática que afecta mayormente a hombres de alrededor de 80 años (Oesterling 1996; Wei et al. 2005; McVary 2007).

2.2. Estados premalignos

Los modelos actuales de carcinogénesis de cáncer de próstata defienden la existencia de un estado premaligno activador. La evidencia obtenida en los últimos años, permite proponer a la inflamación como posible desencadenante de estados premalignos (De Marzo et al. 2007).

El daño causado por un proceso inflamatorio inicialmente conduce a la aparición de atrofia proliferativa inflamatoria (**PIA**) en puntos focales de la zona periférica de la próstata, caracterizado por una respuesta al insulto inflamatorio con hiperproliferación epitelial. La mayoría de los estudios afirman que las regiones atróficas en las que se produce PIA no presentan mutaciones genéticas aunque si se ha observado sobreexpresión de genes antiapoptóticos (De Marzo et al. 1999; Putzi & De Marzo 2000).

La neoplasia intraepitelial prostática (**PIN**) es la lesión premaligna observada con mayor frecuencia en la próstata. Este proceso se establece cuando el estímulo inflamatorio se hace crónico. Se caracteriza por hiperplasia de células luminales y características bioquímicas, fenotípicas y genotípicas similares a los del cáncer de próstata (**CP**), aunque sin la capacidad de invadir la membrana basal (Bostwick et al. 2004; Tomlins et al. 2007; Shen & Abate-Shen 2010; Eminaga et al. 2013).

Se ha observado que las zonas afectadas con PIA pueden mezclarse con aquellas en las que se observa la aparición de PIN e incluso con tejido canceroso, proveyendo así evidencia de que ambos procesos premalignos se producen como una sucesión escalonada que precede al desarrollo y progresión de la carcinogénesis del CP (Packer & Maitland 2016) (Figura 2).

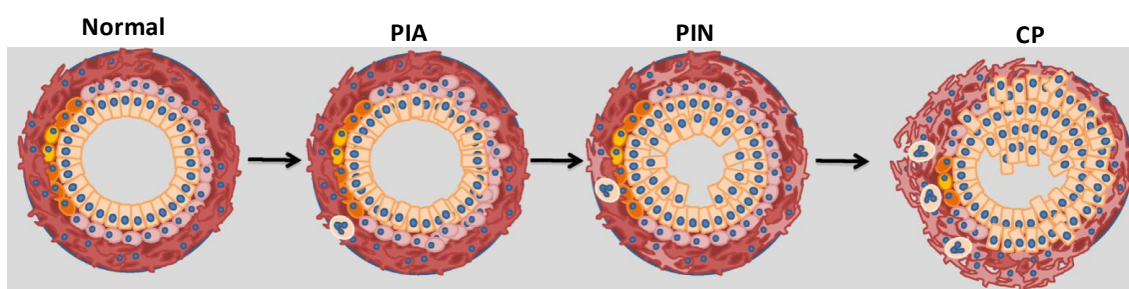


Figura 2. Modelo de progresión del cáncer de próstata. Existen dos estados patológicos previos a la aparición del tumor: la atrofia proliferativa inflamatoria (PIA) y la neoplasia intraepitelial prostática (PIN). La PIA se establece por un proceso inflamatorio inicial que conduce a una respuesta local hiperproliferativa del epitelio. La PIN se establece cuando el estímulo inflamatorio se hace crónico y se caracteriza por una respuesta hiperproliferativa de las células epiteliales y reactividad en la zona estromal sin pérdida de membrana basal. En último término se desarrolla un adenocarcinoma prostático (CP) con una hiperproliferación descontrolada de células epiteliales luminales y basales, que conducen a la disrupción de la membrana basal y esto favorece la infiltración inflamatoria de la zona estromal (Modificado de Packer et al. 2016).

2.3. Cáncer

El cáncer se considera un proceso patológico que resulta de la acumulación de mutaciones somáticas en la progenie de una célula normal, conduciendo a la adquisición de ventajas adaptativas de crecimiento en las células mutadas y en última instancia la capacidad de proliferar descontroladamente (Merlo et al. 2006; Greaves & Maley 2012). Los cánceres humanos más frecuentes surgen de células epiteliales, aunque es posible detectar cánceres que se originan en otros tejidos. En la próstata, el tumor epitelial más habitual es el adenocarcinoma prostático y supone el 95% de los casos detectados, aunque también pueden surgir otros tumores como sarcomas y pequeños carcinomas celulares (van Bokhoven et al. 2003).

2.3.1. Incidencia

El cáncer de próstata (CP) es la segunda neoplasia maligna más común en la población masculina occidental con más de un millón de nuevos casos diagnosticados en el mundo al año, y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer, después del cáncer de pulmón. Se estima que en los países occidentales un hombre tiene una probabilidad aproximada del 10% de desarrollar CP y de un 3-4% de morir por causas relacionadas con éste. El CP es una enfermedad predominantemente del anciano, con un 75% de los casos nuevos diagnosticados después de los 65 años de edad. La incidencia de la enfermedad ha aumentado en los últimos años debido, en parte, a la detección temprana y al aumento de la población masculina mayor de 65 años en la que se sabe que la enfermedad es prevalente (Quon et al. 2011; DeSantis et al. 2014; Ferlay et al. 2015).

2.3.2. Etiopatogenia

A pesar de la abundante información epidemiológica actual, aún no existe un criterio unificado que permita establecer una etiología definitiva que relacione el desarrollo del cáncer de próstata con factores ambientales y genéticos.

Presumiblemente, el cáncer de próstata se desarrolla debido a defectos genéticos y alteraciones epigenéticas en una célula inicial que posteriormente genera un tumor mayor y muy heterogéneo. Las alteraciones genómicas en el CP son altamente variables y heterogéneas de paciente a paciente, e incluso dentro del mismo tumor. Estas disparidades pueden ser explicadas a través de la inestabilidad genómica que se produce en el CP. De hecho, algunos autores han descrito al CP como una “catástrofe epigenética”, debido a que varios cambios ocurridos en el patrón de metilación del ADN pueden ser detectados antes de que las células tumorales adquieran capacidad invasiva sugiriendo que los cambios epigenéticos son eventos anteriores a la iniciación del tumor (Perry et al. 2010; Boyd et al. 2012).

La gran diferencia observada en la incidencia mundial de cáncer de próstata entre los países occidentales y orientales hace pensar que existen factores de predisposición racial y asociados a los diferentes estilos de vida entre estos países

(Jemal et al. 2015). Por otro lado, la dieta y los hábitos alimenticios son factores que contribuyen igualmente al desarrollo de esta enfermedad (Labbé et al. 2014).

Además, los niveles de andrógenos son también factores importantes en el desarrollo de la enfermedad. Desde su morfogénesis, la próstata depende de los andrógenos para desarrollarse, como así también depende de ellos para crecer y desarrollarse durante la pubertad (Risbridger et al. 2005). La mayoría de las células prostáticas expresan AR; sin embargo solo las células lumbinales dependen de estas hormonas para sobrevivir. La expansión de la capa de células lumbinales durante las patologías premalignas y en el CP demuestra que el AR es importante en el desarrollo de la enfermedad (Maitland et al. 2011).

2.3.3. Estatificación

Aunque hay numerosos sistemas de estadificación para evaluar el grado de malignidad de un adenocarcinoma prostático, el propuesto por Gleason es el más utilizado (Gleason & Mellinger 1974). El sistema de Gleason está basado en la identificación de dos patrones histológicos en células de CP de muestras obtenidas por biopsia o cirugía teñidas con Hematoxilina-Eosina. Estos dos patrones son el grado de diferenciación y el grado de invasión del tejido estromal. A cada uno de ellos se le asigna un valor del 1 al 5. El grado Gleason se obtiene sumando los valores obtenidos en cada patrón, de forma que los grados Gleason bajos (2-4) corresponderían a cánceres con mejor pronóstico y los grados Gleason altos (8-10) a los de peor pronóstico (Iczkowski & Lucia 2011).

Hoy en día también se utiliza con fines pronósticos y diagnósticos, otro sistema de nomenclatura del Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC). Este sistema se denomina TNM, siendo T la extensión del tumor primario, N la propagación a órganos linfáticos (ganglios linfáticos loco-regionales) y M la propagación a órganos distantes como otros ganglios linfáticos, hueso, pulmón, hígado, glándula suprarrenal y cerebro, principalmente (Sobin & Compton 2010).

2.3.4. Tratamiento

Las opciones terapéuticas que se aplican en el tratamiento del cáncer de próstata a menudo dependen de la etapa en la que se realiza el diagnóstico.

La resección quirúrgica o prostatectomía radical suele utilizarse en casos de tumores confinados a la próstata que se encuentran en las primeras etapas de desarrollo. Cuando existe un riesgo intermedio a alto de metástasis, se practica la disección de nódulos linfáticos pélvicos en combinación con la prostatectomía radical (Horwich 2006; S. et al. 2013; Joniau et al. 2013).

La radioterapia o el implante de pequeñas bolitas radioactivas (braquiterapia), también se usa en pacientes con CP en las primeras etapas de desarrollo o en los casos en que el estado general de salud del paciente hace que no se pueda realizar una cirugía (Postma 2006; Pugh et al. 2013).

En las etapas más avanzadas de la enfermedad se emplea la terapia de eliminación de andrógenos (*Androgen deprivation therapy*, ADT) o castración química que consiste en la administración de agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH) o antagonistas de la secreción de hormona luteinizante (LH), los cuales reducen la producción de andrógenos por los testículos (Rick & Schally 2015). Esta terapia se puede combinar con la administración de antagonistas de AR para eliminar la acción de los andrógenos residuales generados por las glándulas adrenales. Dichos tratamientos suprimen la proliferación e inducen apoptosis en las células tumorales y son efectivos para el tratamiento de la enfermedad avanzada con hasta un 80% de repuesta inicial. Sin embargo, la progresión hacia un cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC) ocurre muchas veces en tratamientos superiores a los 24 meses, ya que a veces los tumores crecen aún en ausencia de andrógenos. Estos tumores se definen como hormono-resistentes. Este hecho ha motivado la investigación para determinar cuáles son las vías de señalización relacionadas con el desarrollo de este fenotipo en la mayoría de los pacientes que son tratados durante un período de tiempo prolongado con ADT (DeSantis et al. 2014).

Otras opciones para el tratamiento del cáncer de próstata hormono-resistente son la inmunoterapia, mediante la utilización de distintas citoquinas (Antonarakis & Drake 2010), terapia génica (Steiner et al. 1998) o inhibición de receptores de factores de crecimiento (Small et al. 2007).

3. Diferenciación neuroendocrina en el cáncer de próstata

3.1. Células neuroendocrinas en la próstata normal

Las células neuroendocrinas (NE) fueron descritas en la próstata por primera vez por Pretl (Pretl 1944), posteriormente Feyrter planteó un criterio para identificarlas (Feyrter 1951) que finalmente fue ampliado y desarrollado por Pearse como sistema APUD (*amine precursor uptake and decarboxylation*) (Pearse 1969). Estas células han sido descritas y ampliamente estudiadas en otros órganos además de la próstata, incluyendo pulmón, sistema gastrointestinal y páncreas. La mayor parte de nuestro conocimiento actual sobre las células NE proviene de estos estudios, aunque el creciente interés que han despertado las mismas ha hecho que la información específica sobre las células NE en la próstata haya aumentado enormemente en las últimas dos décadas.

Aunque las células neuroendocrinas están presentes en todas las regiones de la próstata al momento del nacimiento, rápidamente desaparecen de las regiones periféricas y vuelven a reaparecer en la pubertad (Cohen et al. 1993). Posteriormente a la pubertad se produce un aumento en el número de células NE hasta llegar al número que persiste desde los 25 hasta los 50 años aproximadamente (Battaglia et al. 1994). Estas células se distribuyen, esparcidas o en pequeños grupos, a lo largo de la próstata pero tienden a ser más abundantes en los ductos mayores, en tanto que se encuentran en menor medida en las porciones acinares. A pesar de que su origen aún está en debate, se considera que derivan de las células troncales epiteliales que dan origen a las demás células epiteliales en la próstata normal (Hudson 2004; Long et al. 2005). Aunque también es posible que las células NE representen un linaje celular independiente originado a partir de células neurogénicas (Aumüller et al. 1999).

Las células neuroendocrinas son células con características mixtas de células epiteliales endocrinas y de neuronas, lo que se correlaciona con el extenso número de productos de secreción que sintetizan (Yuan et al. 2007). Distintos estudios ultraestructurales han puesto de manifiesto que los gránulos de secreción presentes en las células NE son marcadamente heterogéneos en tamaño y forma y están involucrados en el almacenamiento y secreción de una gran variedad de sustancias como serotonina, histamina, cromogranina A, enolasa específica de neuronas, β III-tubulina, calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, katacalcina, neuropéptido Y, péptido intestinal vasoactivo, péptido liberador de gastrina (GRP)/bombesina, somatostatina, proteína relacionada con hormona tiroidea, péptido tipo estimulante de hormona tiroidea, colecistoquinina, adrenomedulina y factor de crecimiento de endotelio vascular, entre otros. Algunos de estos productos han sido hallados en el fluido seminal sugiriendo una posible función en la regulación de la función espermática. Los receptores de estas sustancias han sido detectados tanto en la próstata normal como en el CP (Abrahamsson 1999; Sun et al. 2009; Nelson et al. 2007).

Las células neuroendocrinas son altamente diferenciadas y no tienen actividad proliferativa, dado que se ha visto que no expresan los antígenos de proliferación Ki67

y MIB-1, característicos de células epiteliales. Se encuentran en un estado postmitótico y antiapoptótico ya que usualmente expresan factores antiapoptóticos como survivina y además son Bcl-2 negativas. Entre sus características bioquímicas es de destacar que no expresan AR ni PSA (Krijnen et al. 1993; Bonkhoff 2001; Xing et al. 2001).

En la próstata normal las células neuroendocrinas aparentemente estarían involucradas en distintas funciones paracrinas relacionadas con el crecimiento, diferenciación, función secretora del tejido prostático normal y una potencial vía de diferenciación de las células troncales de manera independiente de andrógenos (Nelson et al. 2007).

3.2. Células neuroendocrinas en el cáncer de próstata

En general el término cáncer de próstata neuroendocrino se refiere a la presencia de células neuroendocrinas, aisladas o en grupos pequeños, tanto en los estados premalignos (PIN y PIA) como en el adenocarcinoma de próstata (Bostwick et al. 2002). Algunos tumores prostáticos están compuestos completa o casi completamente de células con características neuroendocrinas, como es el caso del tumor carcinoide y del carcinoma de células pequeñas, ambos muy raros. Sin embargo, generalmente el porcentaje de células neuroendocrinas en el adenocarcinoma prostático es muy bajo.

Son varias las características moleculares que diferencian las células neuroendocrinas de la próstata normal de las que están presentes en el cáncer de próstata. En primer lugar, estudios inmunohistoquímicos han demostrado que las células NE de la próstata normal expresan citoqueratina 5, un marcador de células basales, mientras que las células NE del CP secretan citoqueratina 18 y fosfatasa ácida prostática, características de células lumbinales (van Bokhoven et al. 2003; Hudson et al. 2003; Vashchenko & Abrahamsson 2005). En segundo lugar, las células NE tumorales son altamente agresivas y tienen capacidad tumorigénica (Oesterling 1992). En tercer lugar, mientras que las células NE de la próstata normal no expresan Bcl-2, una proteína clave para el desarrollo de la apoptosis por vía intrínseca, estudios realizados en células NE tumorales demuestran altos niveles de Bcl-2 (Segal et al. 1994; Xue et al. 1997). En cuarto lugar, las células tumorales prostáticas y células NE tumorales expresan la enzima α -metilacil-CoA racemasa (AMCAR), involucrada en la β -oxidación de los ácidos grasos, pero esta enzima no se expresa en células epiteliales y NE de la próstata normal (Huang et al. 2006).

En el cáncer de próstata hay un aumento de la población de células neuroendocrinas, que se correlaciona con la progresión del tumor y mal pronóstico de la enfermedad. Se ha sugerido que las células NE juegan un papel importante en la progresión del CP debido a que secretan hormonas, neuropéptidos y factores de crecimiento, entre los que destacan bombesina/GRP, serotonina, péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) y somatostatina, con potentes efectos estimulantes de cascadas mitogénicas y angiogénicas en las células cancerígenas

adyacentes y así contribuyen a la proliferación de manera independiente de andrógenos (Figura 3).

Aunque el origen y el mecanismo celular por el cual se produce el enriquecimiento de células neuroendocrinas durante la progresión del cáncer de próstata está poco claro aún, hay evidencia tanto de estudios *in vitro* como de estudios *in vivo* de que las células de CP podrían convertirse en células NE, mediante un proceso conocido como diferenciación neuroendocrina (*Neuroendocrine differentiation*, NED) adquiriendo fenotipo neuroendocrino y expresando marcadores neuronales (Komiya et al. 2013). La idea de que las células NE del CP tienen un origen diferente de las células NE de la próstata normal está bastante aceptada y esto ha permitido proponer que las células NE del CP se diferencian desde las mismas células troncales pluripotentes que originan a las normales, pero debido a una alteración en la regulación del proceso de diferenciación de estas células madre en condiciones patológicas y de eliminación de andrógenos, se favorece el incremento anormal de la población de células NE del CP (Bonkhoff et al. 1995; Bonkhoff 1998). La NED está presente en lesiones metastásicas en médula, pero no en el tumor primario sugiriendo que el proceso de transdiferenciación ocurre en células con capacidad invasiva (Cheville et al. 2002; Roudier et al. 2003). Más aún, resultados de análisis genéticos de muestras clínicas revelan que las células NE tumorales comparten el mismo perfil alélico con las demás células presentes en el tumor pero no con las células epiteliales y NE de la próstata normal (Sauer et al. 2006).

El fenotipo neuroendocrino ha sido reconocido como una respuesta adaptativa al tratamiento hormonal y representa una de las características del cáncer de próstata más agresivo (Vashchenko & Abrahamsson 2005; Nelson et al. 2007; Sun et al. 2009; Wyatt et al. 2016). Ito y colaboradores al igual que Hirano y colaboradores han respaldado esta idea mediante estudios realizados en muestras clínicas de pacientes que han recibido terapia antiandrogénica durante períodos prolongados (superiores a 13 meses) y en ambos casos se ha descrito el aumento de características neuroendocrinas (Ito et al. 2001; Hirano et al. 2004). Los datos obtenidos en muestras clínicas han sido ampliamente validados por estudios *in vivo* ya que se ha observado un aumento de la expresión de marcadores neuroendocrinos en tumores xenógrafos de células PC-295 y PC-310 (células de cáncer de próstata independientes de andrógenos) generados en ratones castrados (Jongsma et al. 1999; Jongsma et al. 2000). Resultados similares fueron observados en tumores xenógrafos de células LNCaP y CWR22 (células de cáncer de próstata sensibles a andrógenos) (Burchardt et al. 1999; Huss et al. 2004) generados en ratones castrados, al igual que en tumores generados en ratones TRAMP (Kaplan-Lefko et al. 2003).

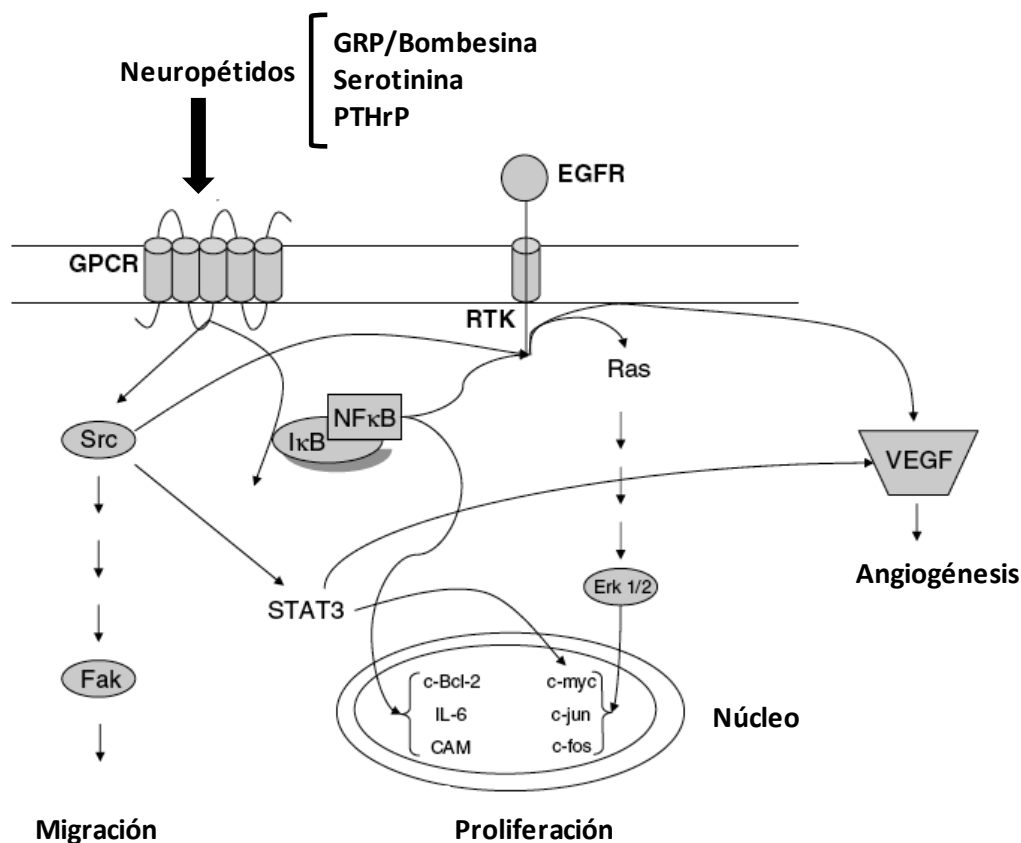


Figura 3. Posibles cascadas de señalización relacionadas con los productos de secreción de las células neuroendocrinas en el cáncer de próstata. Las sustancias secretadas por las células NE activan receptores acoplados a proteína G (GPCR) y a su vez esto activa a Src y NF-κB. En adición a la activación de sus dianas directas, tanto Src como NF-κB, transactivan receptores de factores de crecimiento (RTK). Abreviaturas: CAM (molécula de adhesión celular), EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), ERK1/2 (quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares), FAK (quinasa de adhesión focal), GPCR (receptor acoplado a proteína G), NF-κB (factor nuclear kappa B), GRP (péptido liberador de gastrina), PTHrP (péptido relacionado con la hormona paratiroidea), RTK (receptor tirosín quinasa), VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular). (Modificado de Nelson et al. 2007).

4. Autofagia

4.1. Tipos de muerte celular programada

La regulación del balance entre crecimiento, proliferación y muerte celular es llevada a cabo mediante múltiples mecanismos entre los cuales se encuentra un proceso altamente controlado y conservado denominado muerte celular programada (*Programmed cell death*, PCD). Existen tres tipos de PCD que difieren entre sí por sus características morfológicas, sus procesos reguladores y por su función en el destino celular (Figura 4).

La apoptosis o muerte celular programada I (PCD I) se caracteriza por la condensación de la cromatina, contracción celular, fragmentación cromosómica debido a la digestión controlada del ADN y finalmente segmentación de la célula en cuerpos apoptóticos rodeados por membrana plasmática que son reconocidos y fagocitados sin que se produzca respuesta inflamatoria (Hengartner & Bryant 2000). La apoptosis es inducida genéticamente a través de un programa de suicidio celular. Juega un papel crucial durante el desarrollo celular, pero también en la carcinogénesis, ya que al funcionar como un mecanismo de protección contra la formación y el desarrollo del tumor, su desregulación puede propiciar el proceso tumoral (Russo et al. 2010). Terapéuticamente puede inducirse por múltiples tratamientos como radiación, quimioterapia y drogas inductoras de señales apoptóticas (Mahmood & Shukla 2010; Portt et al. 2011).

La autofagia o muerte celular programada II (PCD II) es un proceso multifactorial que se desencadena de manera escalonada y tiene como consecuencia final la degradación de grandes cantidades de material citoplasmático y organelas. Existe una intrincada colaboración entre autofagia y apoptosis. A veces estos dos procesos ocurren de manera sinérgica y en ocasiones la autofagia es un proceso previo que desencadena la apoptosis (Liu et al. 2011). Este tipo de muerte celular será descrito en mayor detalle en secciones posteriores.

La necrosis o muerte celular programada III (PCD III) se caracteriza por la liberación descontrolada del contenido celular y un patrón típico de daños en el material genético que conduce a una reacción inflamatoria en el tejido necrótico. Este tipo de muerte celular ocurre como consecuencia de ciertas situaciones entre las que se encuentra la isquemia prolongada o el daño tisular. Aunque en principio se pensaba que la necrosis era el resultado físico de un exceso de estímulos desencadenantes de apoptosis, actualmente ha cobrado mayor interés científico el desvelar cuáles son los mecanismos celulares que podrían regular este fenómeno y desencadenarlo independientemente de la apoptosis (Portt et al. 2011).

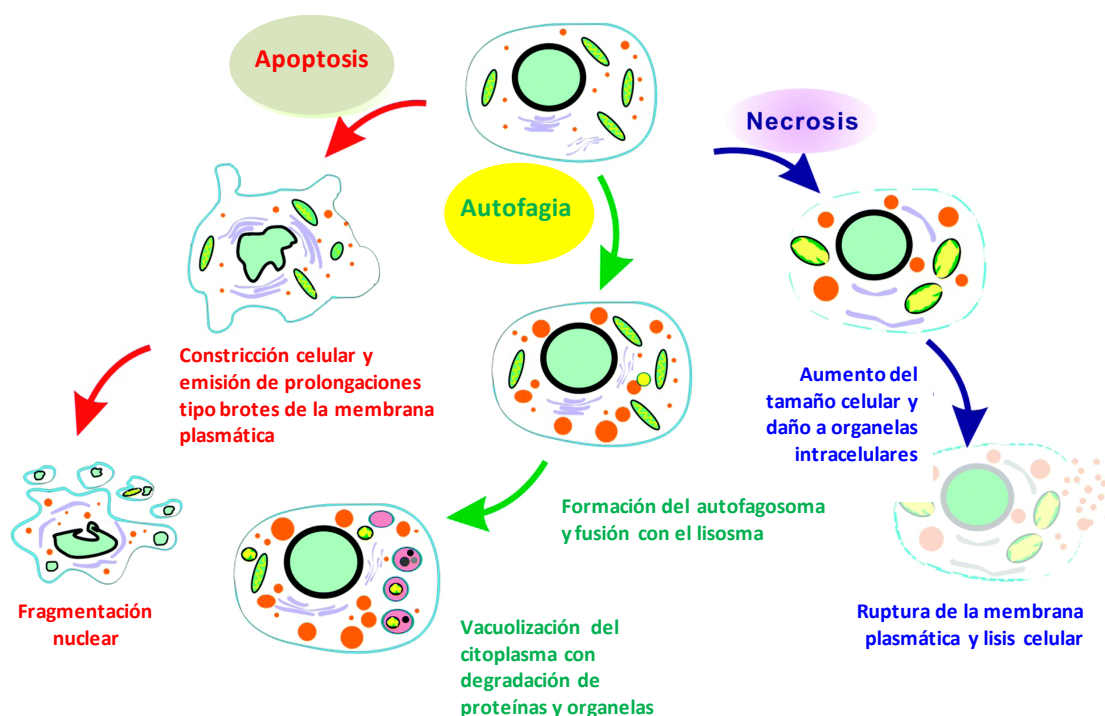


Figura 4. Tipos de muerte celular programada (PCD): apoptosis, autofagia y necrosis. (Modificado de Tan et al. 2014).

4.2. Tipos de autofagia

La autofagia es un proceso catabólico que involucra al lisosoma y está altamente conservado en todas las células eucariotas. Fue descrito por primera vez por De Duve y colaboradores que basaron sus postulados en observaciones realizadas en lisosomas de hígado de rata bajo los efectos del glucagón (Deter & De Duve 1967). En los años recientes la comunidad científica ha redescubierto la autofagia y ha aportado grandes avances para el entendiendo de los mecanismos moleculares y del significado fisiológico y patológico de este proceso (Xie & Klionsky 2007; Mizushima 2007; Levine & Kroemer 2008). De acuerdo con el tipo de material y del camino hacia el lisosoma, la autofagia puede ser clasificada en tres tipos bien definidos: macroautofagia, autofagia mediada por chaperonas (*chaperone-mediated autophagy*, CMA) y microautofagia. Cada uno de estos tres tipos de autofagia posee características morfológicas distintivas pero tienen como mecanismo común la entrega de material al lisosoma (Yang & Klionsky 2010; Mizushima et al. 2008) (Figura 5). Se han descrito variantes adicionales a estos tres tipos que se han nombrado según el orgánulo selectivamente degradado, como por ejemplo: mitofagia (autofagia de mitocondria), pexofagia (autofagia de peroxisomas), lipofagia (autofagia de liposomas), agregofagia (autofagia de agregados intracelulares), reticulofagia (autofagia de retículo endoplasmático) y ribofagia (autofagia de ribosomas) (Bernales et al. 2006; Kim et al. 2007; Kraft et al. 2008).

La autofagia ha sido relacionada con un rango de funciones fisiológicas muy extenso como la adaptación a la falta de nutrientes, la diferenciación celular, el desarrollo tisular, la degradación de organelas anormales y/o dañadas, la respuesta

inmune adaptativa, la regulación de la relación vida/muerte celular y la supresión tumoral. Como cabe esperar, al tener tantas funciones fisiológicas, el malfuncionamiento de la autofagia se correlaciona con una lista en permanente crecimiento de enfermedades tan variadas como enfermedades neurodegenerativas, desórdenes cardiovasculares, hepáticos y pulmonares, patologías infecciosas, miopatías, enfermedades metabólicas como la diabetes, envejecimiento y cáncer (Levine & Kroemer 2008; Deretic & Levine 2009; Wirawan et al. 2012).

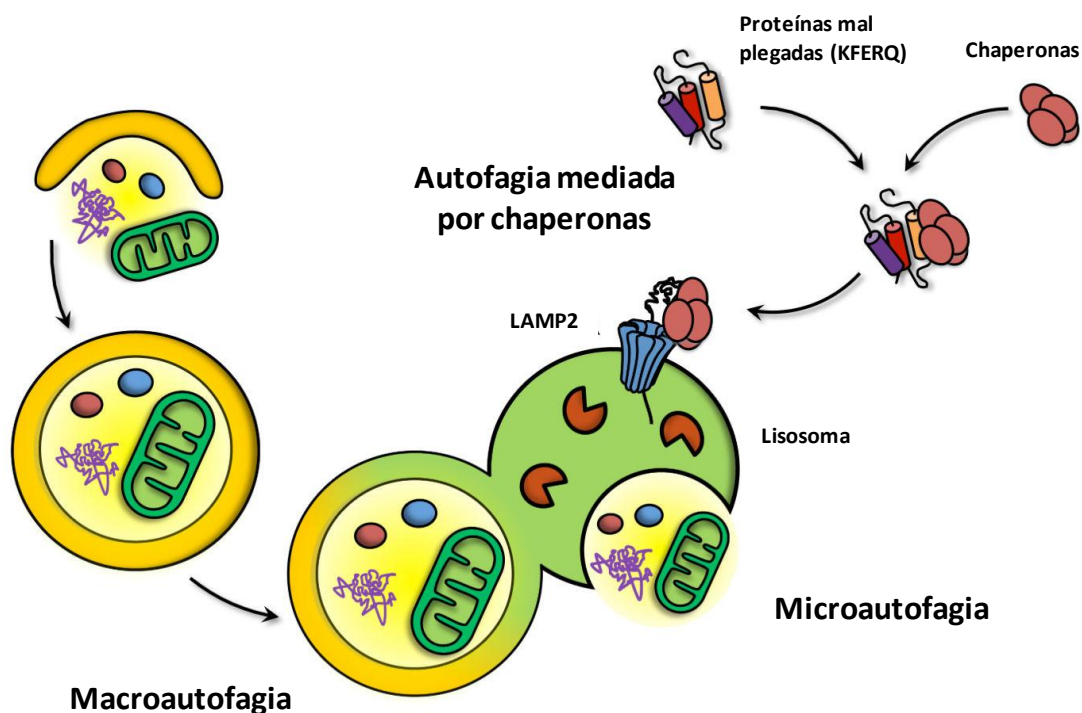


Figura 5. Los tres tipos principales de autofagia. Durante la macroautofagia se degradan grandes cantidades de citoplasma que se engloban en vesículas de doble membrana y se fusionan con el lisosoma. Durante la autofagia mediada por chaperonas, proteínas mal plegadas que poseen un motivo específico en su estructura (KFERQ) son reconocidas por chaperonas y translocadas hacia el lumen lisosomal a través de la proteína LAMP2 presente en la membrana del lisosoma. Por último, en la microautofagia se procede directamente a la degradación de sustratos que se introducen en el lisosoma a través de la invaginación de la membrana de éste. (Modificado de Gatica et al. 2015).

4.2.1. Macroautofagia

De los tres tipos principales de autofagia, la macroautofagia (denominada en términos generales simplemente autofagia) es la más estudiada. En condiciones normales, la autofagia colabora en el mantenimiento celular mediante la degradación de organelas superfluas y dañadas, mientras que en ciertas situaciones de estrés, como la disminución de los niveles energéticos o de nutrientes, se activa para degradar material citoplasmático para la obtención de metabolitos intermediarios de vías biosintéticas permitiendo la supervivencia celular. Así por lo tanto, la autofagia es considerada un proceso citoprotector activado en respuesta al daño celular y de adaptación al estrés metabólico (Parzych & Klionsky 2014).

El proceso de la macroautofagia se desarrolla en una secuencia de etapas que pueden ser clasificadas según sus características morfológicas en: **inducción y nucleación, elongación, cierre y maduración, fusión y degradación** (Figura 6).

La primera etapa comienza con el aislamiento de una estructura membranosa que se denomina fagóforo, cuyo origen en mamíferos es controvertido y hay quienes postulan que deriva de vesículas de doble membrana que pueden emerger del RE (Axe et al. 2008; Ylä-Anttila et al. 2009; Hayashi-Nishino et al. 2009), del trans-Golgi (Takahashi et al. 2011), de la membrana plasmática (Ravikumar, Moreau & Rubinsztein 2010; Ravikumar, Moreau, Jahreiss, et al. 2010), de los endosomas (Simonsen & Tooze 2009) o de la mitocondria (Hailey et al. 2010). La inducción y nucleación es la característica morfológica distintiva entre la macroautofagia y los otros dos tipos de autofagia que involucran tráfico de membranas (Yang & Klionsky 2010; Parzych & Klionsky 2014). Posteriormente a la nucleación, el fagóforo se elonga y engulle estructuras tan variadas como agregados proteicos, organelas o ribosomas, para finalmente cerrarse y formar estructuras de doble membrana llamadas autofagosomas. Los autofagosomas utilizan los motores de dineína para moverse a lo largo del sistema de microtúbulos y alcanzar a los lisosomas con quienes se fusionan y dan origen a los autofagolisosomas. Sin embargo muchos autofagosomas, pueden en ciertas ocasiones, fusionarse con estructuras llamadas anfisomas que provienen del sistema endocítico (Eskelinen 2005; Fader & Colombo 2009; Simonsen & Tooze 2009). La degradación del material contenido en los autofagolisosomas se lleva a cabo por la acción de las múltiples hidrolasas ácidas que residen en el interior del lumen lisosomal.

A nivel molecular, la macroautofagia es un proceso altamente regulado que consta de una maquinaria compleja que controla cada etapa del mismo y permite su correcta ejecución (Meijer & Codogno 2004; Mehrpour et al. 2010; Chen & Klionsky 2011; Boya et al. 2013). Actualmente se conoce la existencia de más de 30 genes relacionados con la autofagia (*Autophagy related gene*, ATG) que codifican las proteínas Atg correspondientes. Estas proteínas juegan un papel fisiológico crucial en cada una de las etapas de la macroautofagia y organizan la mayor parte del proceso (He & Klionsky 2009).

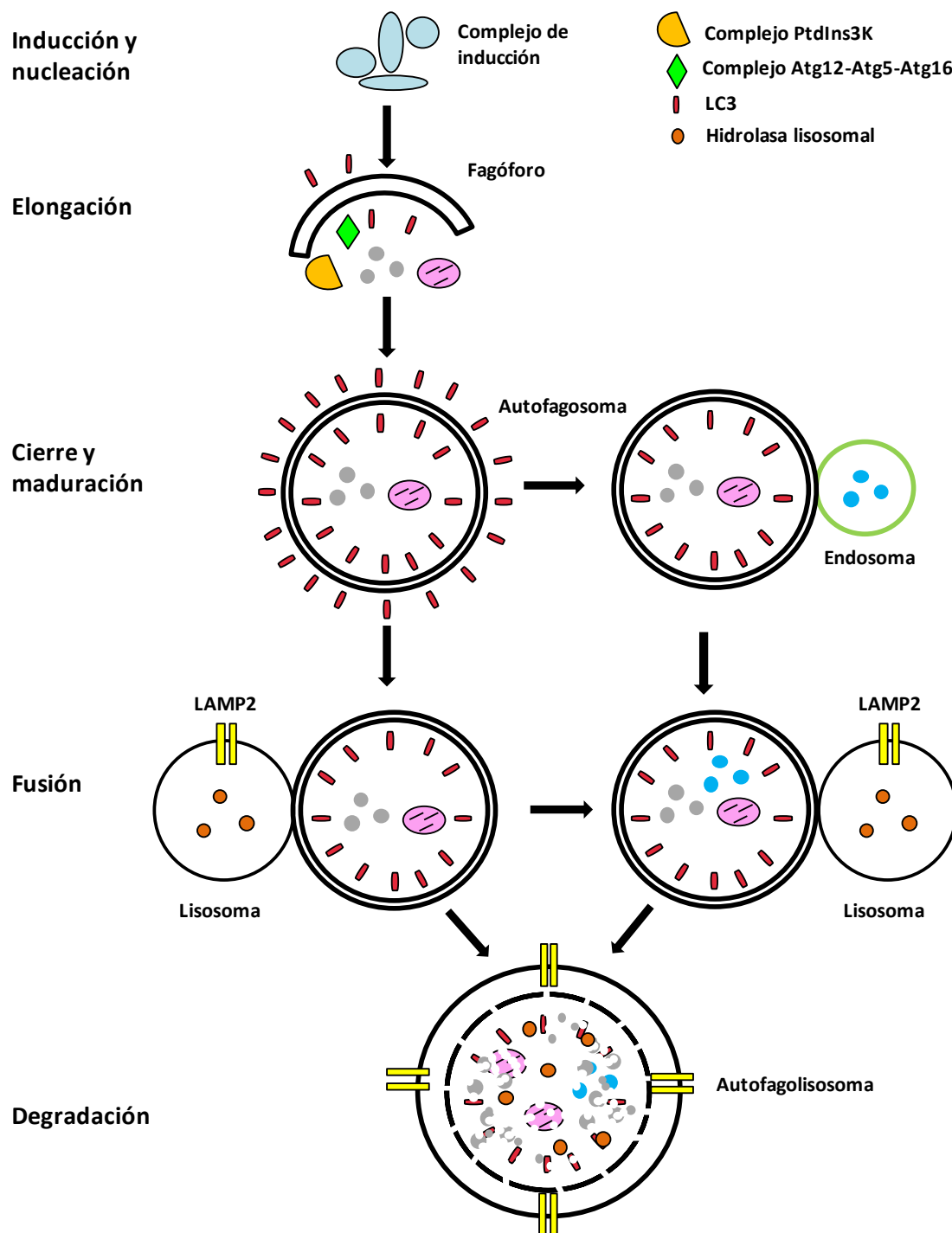


Figura 6. Etapas de la macroautofagia. (Modificado de Parzych & Klionsky 2014).

Inducción y nucleación: En mamíferos, la inducción de la macroautofagia es regulada por un complejo de quinasas formado por ULK1/ULK2-Atg13-RB1CC1-C12orf44. El complejo de inducción tiene una conformación estable y se forma de manera independiente del estado de nutrientes. En presencia de niveles altos de nutrientes mTORC1 se asocia con el complejo de inducción y lo inactiva, mediante la fosforilación de ULK1/2 y Atg13. En condiciones de niveles bajos de nutrientes o por tratamiento con rapamicina, por el contrario, mTORC1 se disocia del complejo, lo que lleva a una desfosforilación de ULK1/2 y Atg13 y como consecuencia se produce la inducción de la autofagia (Figura 7). Durante la nucleación, se requiere la actividad del complejo formado por PI3K III-p150-beclina-1, denominado de manera general complejo PtdIns3K. Este trímero actúa durante la formación de fagóforo tanto en la macroautofagia, al unirse con Atg14, como en la vía endocítica al unirse a UVRAG (Figura 7B) (Kihara et al. 2001; Itakura & Mizushima 2010). La regulación del complejo PtdIns3K sucede a través de la interacción con beclina-1. La unión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 con beclina-1 impide que esta última interactúe con PI3K III, lo que en definitiva conduce a una inhibición de la macroautofagia. La interacción de beclina-1 con KIAA0226/Rubicon, también inhibe la actividad de PI3K III cuando el complejo está unido a UVRAG. La regulación positiva del complejo de nucleación es a través de la interacción de beclina-1 con la proteína Ambra1 (en la macroautofagia) y la proteína SH3GLB1/Bif-1 (en la vía endocítica) (Fimia et al. 2007; Matsunaga et al. 2009) (Figura 7B) (Tabla 1).

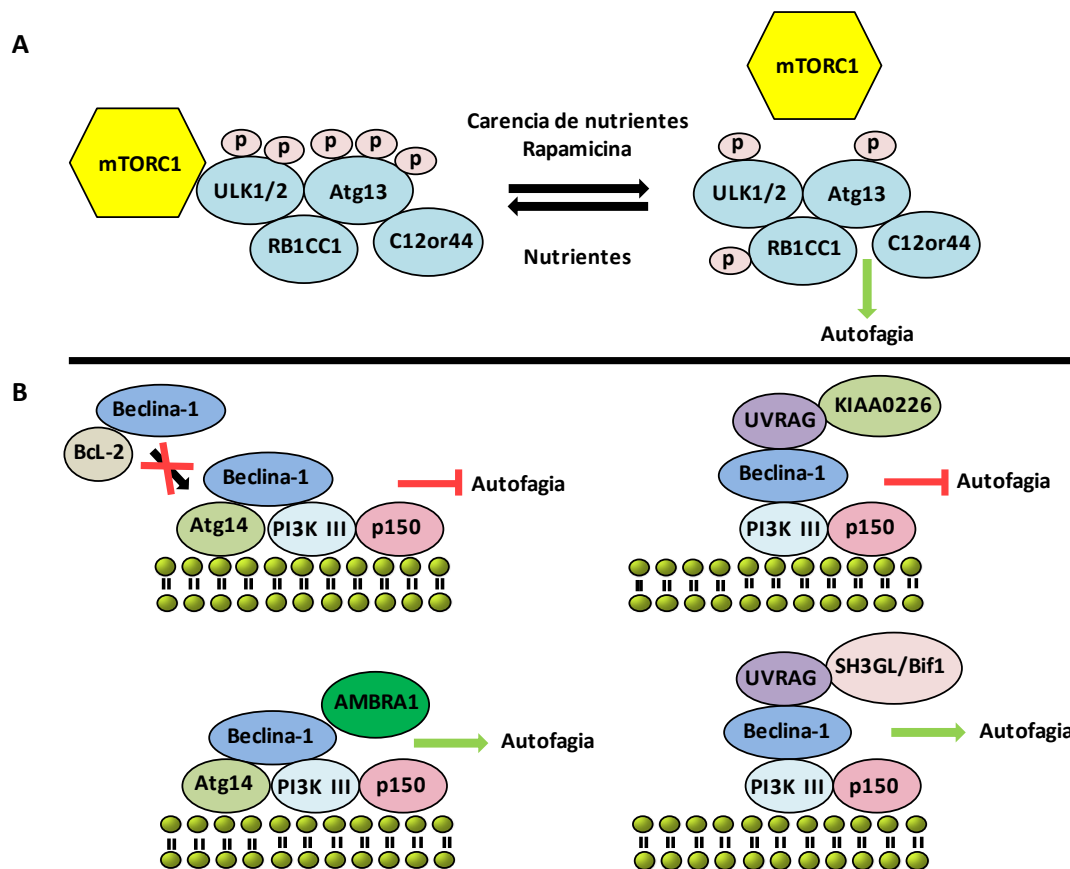


Figura 7. A. El complejo de inducción. B. El complejo de nucleación. (Modificado de Parzych & Klionsky 2014).

Elongación y maduración: En esta etapa intervienen dos sistemas de proteínas denominados UBL (*ubiquitin-like systems*) cuyas actividades durante la expansión del fagóforo se superponen (Ohsumi 2001). El primer sistema UBL está constituido por las proteínas Atg12–Atg5–Atg16L1. Una vez que se produce la unión covalente e irreversible de Atg12 con Atg5, proceso en que intervienen secuencialmente Atg7 (enzima activadora de ubiquitina, tipo E1) y Atg10 (enzima conjugadora de ubiquitina, tipo E2), se produce la unión de Atg16L a Atg5 de manera no covalente. El complejo Atg12–Atg5–Atg16L1 dimeriza formando largas cadenas (Kuma 2002) que interaccionan con la membrana del fagóforo en expansión (Figura 8A) (Tabla 1). La regulación del complejo Atg12–Atg5–Atg16L1 es llevada a cabo por la proteína RAB33A que se une a Atg16L y la inhibe (Itoh et al. 2008). Por su parte, Atg12, Atg5 y Atg7 son reguladas negativamente por acetilación mediada por la acetiltransferasa KAT2B/p300 (Lee & Finkel 2009). El segundo sistema UBL involucrado en la expansión del fagóforo y posterior cierre del autofagosoma está formado por la proteína LC3. Esta proteína se expresa en la mayoría de las células y se localiza en el citoplasma, pero en condiciones de inducción de autofagia sufre el procesamiento proteolítico a manos de la cisteína proteasa Atg4 que escinde el extremo C-terminal resultando una cadena denominada LC3 I. Seguidamente, Atg7 activa la glicina expuesta en el extremo C-terminal de LC3 I de manera ATP-dependiente y esto permite la transferencia de LC3 I activa hacia Atg3 (enzima con actividad tipo E2) (Kirisako et al. 2000). Finalmente el extremo C-terminal de LC3 I es conjugado covalentemente con fosfatidiletanolamina (PE) dando lugar a la forma lipídica que recibe el nombre de LC3 II. El reclutamiento e integración de LC3 II en el interior y exterior de la membrana del fagóforo en crecimiento dependen de la actividad de Atg5–Atg12–Atg16L (complejo enzimático que une ubiquitina, tipo E3) (Figura 8B) (Tabla 1), aunque una vez que se ha producido el cierre y la formación definitiva del autofagosoma, LC3 II se encuentra solo en la cara interna del mismo (Kirisako et al. 2000; Hanada et al. 2007; Fujita et al. 2008). Varios estímulos estresantes regulan la macroautofagia a nivel del sistema de conjugación LC3. La lipidación de LC3 se acelera en condiciones de escasez de nutrientes y con otros estímulos (Kabeya 2000).

Cierre y fusión: Una vez que se ha producido la expansión del fagóforo, éste se cierra para formar un autofagosoma, el cual se desplazará para alcanzar lisosomas, fusionarse con ellos y degradar el contenido que lleva en su interior. Este proceso de fusión da origen a una estructura denominada autofagolisosoma. Esta etapa es regulada por la proteína UVRAG, que se asocia con el complejo PtdIns3K, activa a la proteína GTPasa Rab7 y promueve la fusión (Jäger et al. 2004; Liang et al. 2008). Se ha sugerido que algunos componentes de la maquinaria SNARE, como VAM7, VAM9 o sintaxina 17, se localizan en el autofagosoma cerrado y maduro y son necesarios para la fusión con endosomas/lisosomas (Fader & Colombo 2009; Furuta et al. 2010; Itakura et al. 2012).

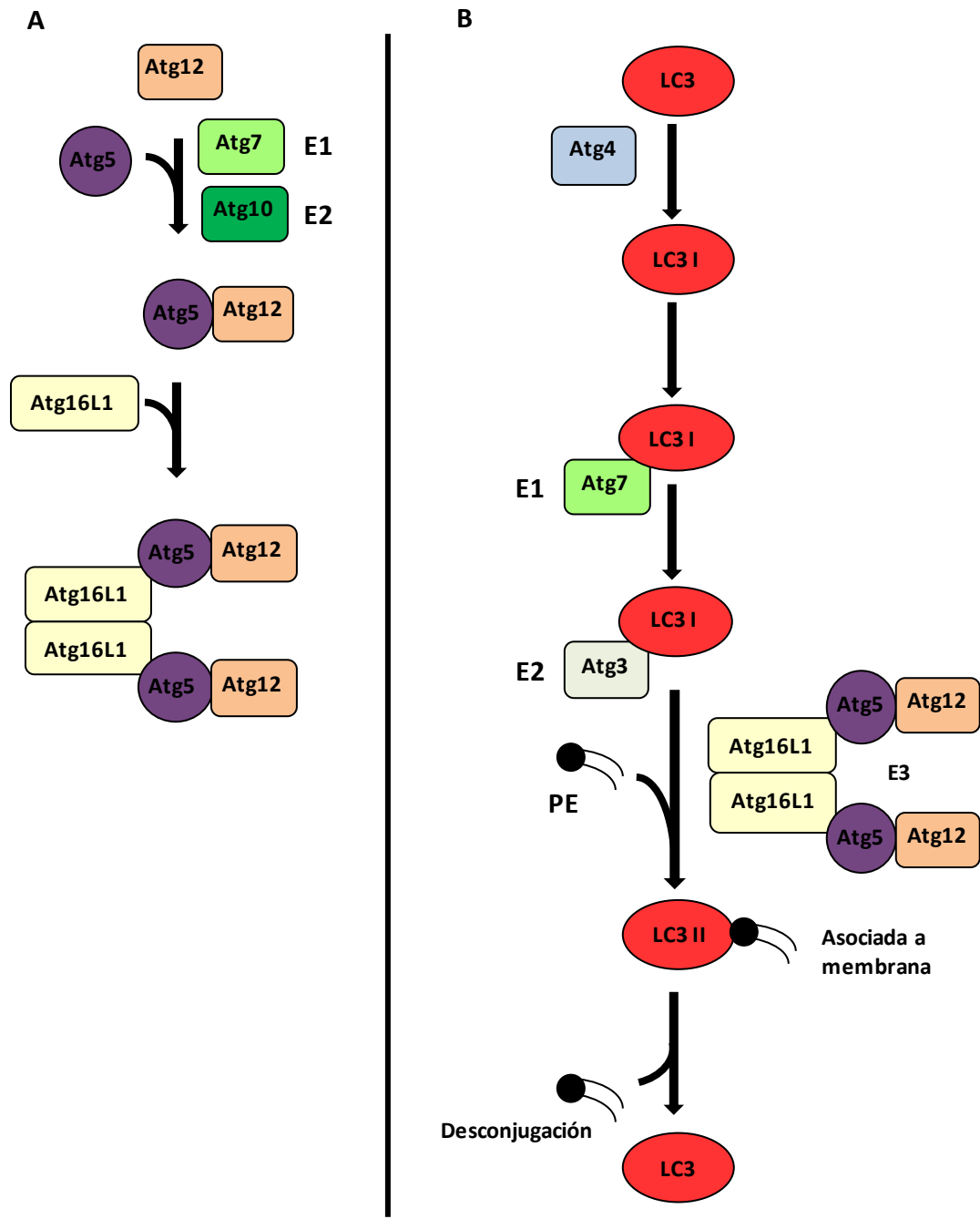


Figura 8. A. El complejo de conjugación Atg12-Atg5-Atg16L1. B. El complejo de conjugación LC3. PE: fosfatidiletanolamina. (Modificado de Parzych & Klionsky 2014).

En la siguiente tabla se recogen las principales proteínas implicadas en el proceso de autofagia y se señalan sus funciones.

Etapas	Proteína	Características
Inducción	ULK1/2	Proteína quinasa fosforilada por mTORC1
	Atg13	Proteína quinasa fosforilada por mTORC1
	RB1CC1	Proteína de anclaje para ULK1/2 y Atg13
	C12orf44	Interacción con Atg13
Nucleación	PI3K III	Formación de complejo PtdIns3K
	P150	Formación de complejo PtdIns3K
	Beclina-1	Formación de complejo PtdIns3K
	Atg14	Subunidad autofágica específica
	UVRAG	Regulación positiva y negativa
	AMBRA1	Regulación positiva
	KIAA0226/Rubicon	Regulación negativa
SH3GLB1/Bif-1	Regulación positiva	
Elongación	Atg12	Proteína tipo ubiquitina, se une covalentemente con Atg5
	Atg5	Proteína con plegamientos tipo ubiquitina, forma parte del complejo Atg12-Atg5-Atg16L1
	Atg16L1	Proteína tipo ubiquitina, forma un homodímero que interactúa con Atg5
	Atg7	Enzima tipo E1
	Atg10	Enzima tipo E2
	LC3	Proteína tipo ubiquitina, se conjuga con fosfatidiletanolamina
	Atg4	Hidrolasa del extremo C-terminal de LC3
	Atg3	Enzima tipo E1

Tabla 1. Proteínas involucradas en la macroautofagia.

4.2.2. Autofagia mediada por chaperonas

La autofagia mediada por chaperonas (CMA) es un tipo de autofagia que degrada proteínas citosólicas solubles mal plegadas. Inicialmente se creía que la CMA degradaba “a granel” este tipo de proteínas, sin ningún tipo de especificidad. Pero a principios de los años 80 comenzó a pensarse la idea de que en realidad había algo en la estructura de ciertas proteínas citosólicas que permitía que fueran degradadas por esta vía autofágica (Backer et al. 1983). El análisis individual de todas las proteínas degradadas por CMA permitió establecer la existencia de un motivo específico en la secuencia de aminoácidos de dichas proteínas (KFERQ) y condujo a la identificación de la chaperona citosólica Hsc70 capaz de reconocer dicho motivo (Chiang & Dice 1988; Dice & Chiang 1989; Dice & Terlecky 1990). Esta chaperona junto a sus co-chaperonas (Bag1, Hip, Hop y Hsc40) llevan los sustratos hacia la superficie de los lisosomas. Posteriormente a esta etapa de reconociendo, el complejo sustrato-chaperona se ancla en la membrana a través de la interacción con la cola citosólica de una proteína transmembrana de un solo paso, LAMP2A, que actúa como un receptor en esta vía autofágica (Cuervo & Dice 1996). La internalización de las proteínas sustrato precisa que éstas se encuentren completamente desplegadas y de la presencia en el lumen lisosomal de Hsc70 (lys-Hsc70) (Agarraberes et al. 1997). Cuando la translocación se ha producido, los sustratos son rápidamente degradados mediante la acción de las hidrolasas lisosomales (Figura 9).

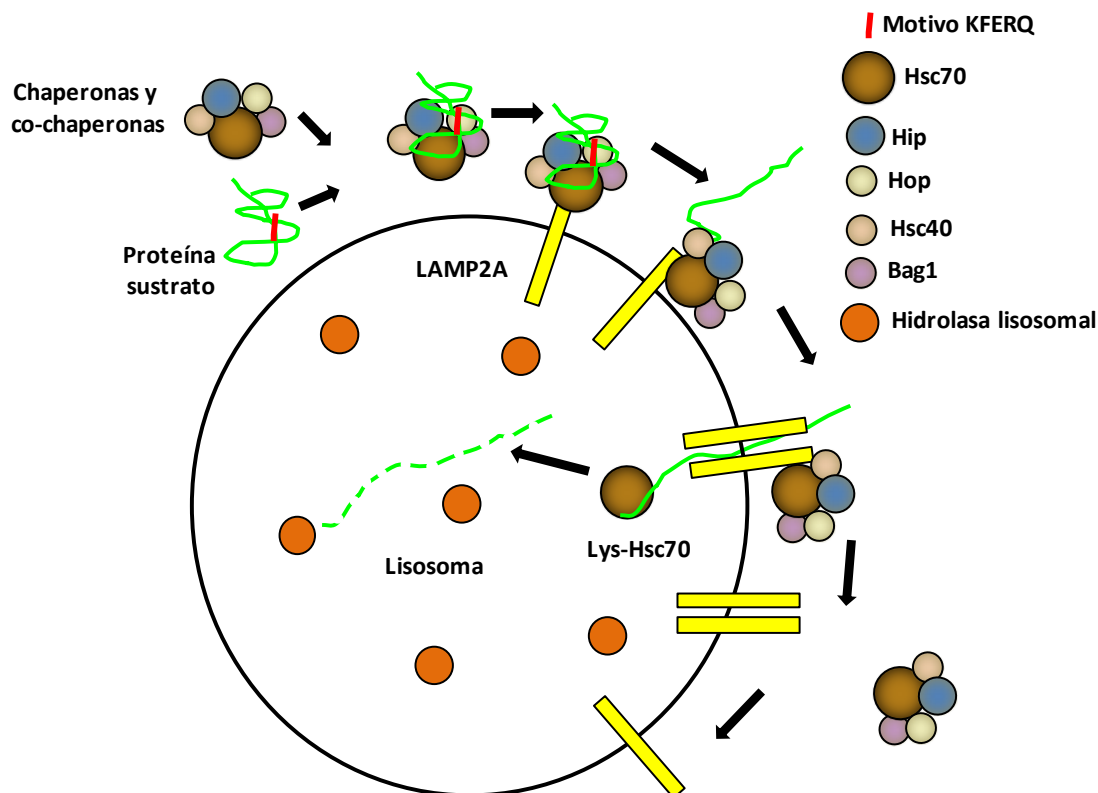


Figura 9. Autofagia mediada por chaperonas. (Modificado de Cuervo 2010).

LAMP2 (*lysosomal-associated membrane protein tipo 2*) es una proteína de único paso transmembrana que pertenece a una familia de proteínas de membrana lisosomal altamente glicosiladas cuya función es mantener la estabilidad lisosomal y actuar en la autofagia. Estructuralmente consiste en un polipéptido de aproximadamente 44 kDa con una cola citoplasmática corta, un dominio transmembrana y un dominio luminal extenso. Existen 3 isoformas de LAMP2 surgidas por procesamiento alternativo del mensajero: LAMP2A, LAMP2B y LAMP2C que difieren en sus secuencias de aminoácidos confinados en sus regiones transmembrana y en sus colas citosólicas. Solo LAMP2A actúa como un receptor de membrana lisosomal en la CMA y aun es desconocido el papel que LAMP2B y LAMP2C cumplen en la membrana lisosomal. Además, LAMP2A puede localizarse en la matriz lisosomal, pero su origen aún no está claro. Se ha propuesto que podría surgir como consecuencia de procesos proteolíticos o cambios conformacionales que actúan sobre la región transmembrana y originan fragmentos de degradación (Fukuda 1991; Saftig & Klumperman 2009).

Además de las características distintivas de la CMA en cuanto a la especificidad de sustrato, a diferencia de otros tipos de autofagia, la CMA no requiere la formación de vesículas ya que el material a degradar por esta vía es directamente translocado a través de la membrana lisosomal (Dice 2007; Cuervo 2010).

4.2.3. Microautofagia

El término microautofagia fue acuñado por primera vez por De Duve y colaboradores en 1967 y utilizado durante las dos décadas siguientes para describir la presencia de organelas similares a lisosomas que contenían múltiples vesículas atrapadas en su lumen (lisosomas multivesiculares). Actualmente, varios estudios sugieren otra visión de la microautofagia, en la que la membrana del lisosoma se invagina y engloba el material a degradar formando túbulos desde los cuales se desprenden vesículas pequeñas en el interior del lisosoma para su posterior degradación (Cuervo 2004; Todde et al. 2009). La microautofagia ha sido considerada tradicionalmente como una forma de autofagia constitutivamente activa en la degradación de proteínas de vida media larga y organelas. Sin embargo el conocimiento de cada uno de los pasos, las proteínas involucradas, la selección del material a degradar y los mecanismos reguladores de este proceso está aún en sus primeros pasos en comparación a lo que se conoce actualmente de la macroautofagia (Mijaljica et al. 2011).

5. Mecanismos de señalización relacionados con la supervivencia celular en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata.

5.1. Vía PI3K/Akt

La vía de señalización PI3K/Akt regula diversos procesos celulares como metabolismo, supervivencia, proliferación, apoptosis, crecimiento y migración celular (Engelman et al. 2006; Chalhoub & Baker 2009; Vanhaesebroeck et al. 2012).

La familia de las fosfatidil inositol 3 quinasas (PI3Ks) ha sido clasificada en tres grupos diferentes: PI3K de clase I (PI3K I), PI3K de clase II (PI3K II) y PI3K de clase III (PI3K III), basándose dicha clasificación en sus estructuras y especificidad de sustrato.

Los miembros del grupo PI3K de clase I han sido subdivididos de acuerdo con el receptor que los activa. Así, PI3K IA se activa por la unión de factores de crecimiento a los receptores tirosín quinasa (RTK), mientras que PI3K IB se activa a través de receptores acoplados a proteínas G (*G protein-coupled receptors*, GPCRs). Los miembros de la clase IA son heterodímeros formados por una subunidad reguladora p85 (con tres isoformas: α , β , y γ) y una subunidad catalítica p110 (con tres isoformas α , β , y δ). Los miembros de la clase IB están formados por una subunidad reguladora p101 y una subunidad catalítica p110 γ . La activación de un receptor tirosín quinasa (RTK) o de un receptor GPCR a partir de la unión de insulina, factores de crecimiento, lipopolisacárido A (LPA) o citoquinas, induce el reclutamiento de PI3K I hacia la membrana plasmática donde se produce la fosforilación de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) dando lugar a fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato (PIP₃). Este segundo mensajero activa una serie de cascadas de señalización dependientes e independientes de Akt que regulan funciones celulares como crecimiento, metabolismo, motilidad, supervivencia y transformación. La fosfatasa PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) es una fosfatasa que regula negativamente la actividad de PI3K I, desfosforilando a PIP₃ y convirtiéndolo en PIP₂ con lo cual la activación de sus dianas no se produce (Engelman et al. 2006; Thorpe et al. 2015) (Figura 10A).

Existen tres isoformas de PI3K de clase II: PI3K II α , PI3K II β y PI3K II γ , codificadas por genes diferentes (PIK3C2A, PIK3C2B y PIK3C2G respectivamente). Este miembro de la familia de PI3K es monomérico y no posee subunidad reguladora. PI3K II α y PI3K II β tienen expresión ubicua, mientras que la expresión de PI3K II γ está restringida a hígado, próstata y mama (Falasca & Maffucci 2012). PI3K de clase II puede ser activada por hormonas, factores de crecimiento, quimioquinas, citoquinas, fosfolípidos y Ca⁺². Esta clase de PI3K fosforila fosfatidil inositol (PI) dando lugar a fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP). El papel fisiológico de PI3K II no está claro aún, pero estudios recientes sugieren que PI3K II α es importante en la regulación de la angiogénesis y la función ciliar (Yoshioka et al. 2012; Franco et al. 2014). Adicionalmente, se ha demostrado que PI3K II α y PI3K II β intervienen en la regulación funciones celulares como el crecimiento y la supervivencia. La familia de las fosfatasas miotubularinas (MTM) remueven el fosfato en posición 3' de PIP y en consecuencia inactivan a PI3K II (Gaidarov et al. 2001; Thorpe et al. 2015) (Figura 10B).

La PI3K de clase III, o Vps34, es codificada por el gen PI3KC3. PI3K III forma un heterodímero con p150 (codificada por el gen PIK3R4). En mamíferos, PI3K III se expresa de manera ubicua y desempeña funciones en la regulación del crecimiento celular en respuesta a condiciones de ayuno a través de mTORC1 y en la activación de la autofagia. PI3K III puede ser activada por estímulos que incluyen amino ácidos, glucosa y otros nutrientes y una vez activa fosforila fosfatidil inositol (PI) dando lugar a fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP). Al igual que PI3K II, la familia de las fosfatasas miotubularinas (MTM) desfosforilan la posición 3' de PIP e inactivan a PI3K III. (Wurmser & Emr 2002; Nobukuni et al. 2005; Thorpe et al. 2015) (Figura 10C).

La proteína Akt, actualmente conocida como proteína quinasa B (PKB), es una serín/treonín quinasa que juega un papel central en la vía de señalización de PI3K. Existen tres isoformas de Akt: Akt1 (PKB α), Akt2, (PKB β) y Akt3 (PKB γ) (Gonzalez & McGraw 2009). La activación de Akt depende de PI3K de clase I. Esta quinasa genera fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato (PIP₃) y este segundo mensajero recluta Akt hacia la membrana plasmática donde se produce la activación mediante dos fosforilaciones sucesivas en distintos residuos. La primera fosforilación sucede en treonina 308, mediante la quinasa dependiente de fosfatidilinositol 1 (PDK1) y la segunda en serina 473 mediante el complejo 2 de la proteína diana de rapamicina en los mamíferos (mTORC2). Una vez activada, Akt se desplaza desde la membrana plasmática al citosol y al núcleo donde promueve la fosforilación de diferentes y muy variadas proteínas diana (Liu et al. 2009) (Figura 11). Desde su descubrimiento, Akt ha sido el objeto de estudio de numerosos grupos de investigación con el fin de establecer su papel en la progresión tumoral, el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación y supervivencia celular. La diversidad de funciones realizadas por Akt es posible gracias a la existencia de las tres isoformas descritas, debido a que cada una lleva acabo funciones específicas pero a su vez se solapan entre sí, lo que permite cubrir un abanico muy grande de funciones biológicas.

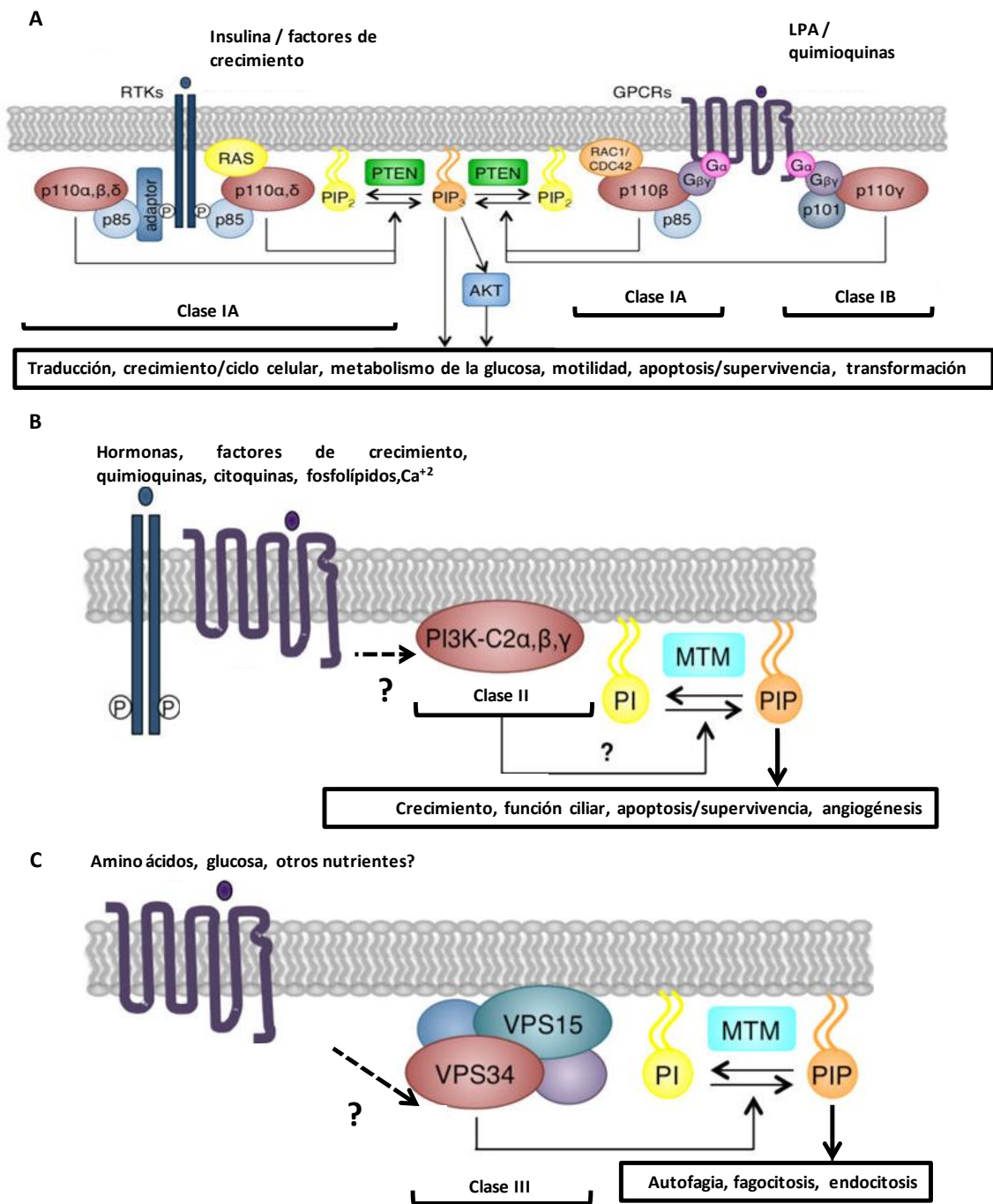


Figura 10. Señalización celular mediada por las distintas isoformas de PI3K. A. PI3K de clase I B. PI3K de clase II (PI3K2). C. PI3K de clase III (Vps34). VPS15: p150. (Modificado de Thorpe et al. 2015).

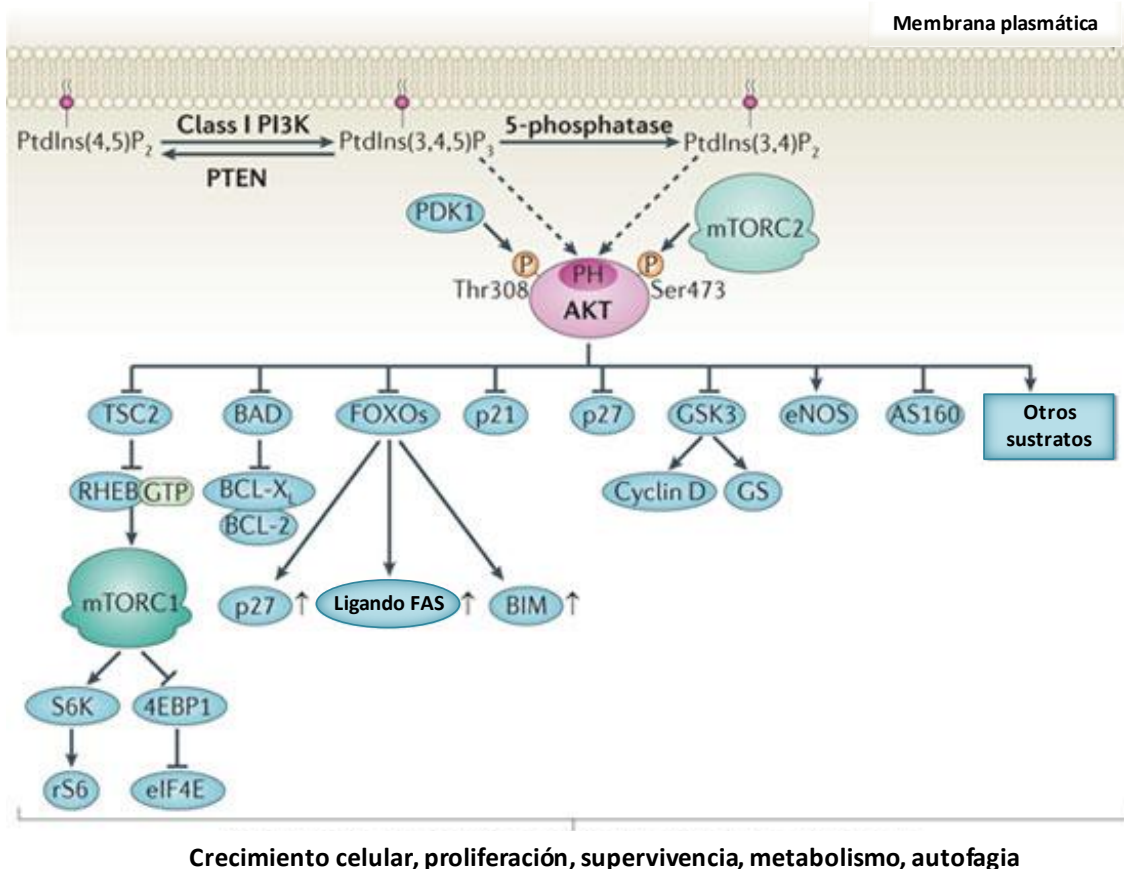


Figura 11. Vía de señalización PI3K/Akt. El aumento de fosfatidilinositol-3, 4, 5-trisfosfato (PIP_3) asociado a la activación de PI3K de clase I favorece la unión de Akt mediante su dominio PH a PIP_3 y su posterior translocación a la membrana plasmática. Posteriormente, sobre Akt actúan dos quinasas activadoras: PDK1 y mTORC2. En su forma bifosforilada, Akt es capaz de fosforilar, por su parte, un amplio rango de sustratos, ya sea activando o inhibiéndolos, y esto resulta en un amplio abanico de mecanismos celulares y funciones biológicas. 4EBP1, *eIF4E-binding protein 1*; AS160, *AKT substrate of 160 kDa*; BAD, *BCL-2 antagonist of cell death*; BIM, *BCL-2-interacting mediator of cell death*; eIF4E, *eukaryotic translation-initiation factor 4E*; eNOS, *epithelial nitric oxide synthase*; FOXO, *forkhead box O*; GS, *glycogen synthase*; GSK3, *GS kinase 3*; GTP, *guanosine triphosphate*; PTEN, *phosphatase and tensin homologue*; RHEB, *RAS homologue enriched in brain*; rS6, *ribosomal S6 protein*; S6K, *S6 kinase*; TSC, *tuberous sclerosis 2*. (Modificado de Vanhaesebroeck et al. 2012).

Uno de los sustratos de Akt es la proteína diana de rapamicina en los mamíferos (mTOR), serín/treonín quinasa formada por dos complejos estructural y funcionalmente distintos: el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2) (Hay & Sonenberg 2004; Laplante & Sabatini 2012). Ambos complejos se localizan en diferentes compartimentos subcelulares, lo que repercute tanto en su activación como en su función (Wullschleger et al. 2006; Betz & Hall 2013; Huang & Fingar 2014). El complejo mTORC1 está compuesto por las proteínas raptor, PRAS40 y mLST8 y su actividad es estimulada por insulina, factores de crecimiento, suero, ácido fosfatídico, aminoácidos (particularmente leucina) y por el estrés oxidativo (Wullschleger et al. 2006; Kim et al. 2002; Fang et al. 2001). mTORC1 controla el crecimiento celular a través de la fosforilación de la quinasa de S6 (p70S6K) y de 4E-BP1 (Sparks & Guertin 2010). Por su parte, el complejo mTORC2 se compone de las proteínas Sin1, rictor y mLST8 (Sabatini 2006) y es el responsable de fosforilar a Akt en la serina 473, con lo cual está íntimamente relacionado con el control del metabolismo y la supervivencia (Betz & Hall 2013; Betz et al. 2013) (Figura 11).

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR ha sido fuertemente implicada en la progresión del cáncer de próstata (Chalhoub & Baker 2009; Chang et al. 2015). Se sabe que en el 50-80% de los casos de cáncer de próstata avanzado y aproximadamente en el 20% de las lesiones localizadas se produce una delección del gen supresor de tumores PTEN encontrándose así esta vía sobre activada (Lee et al. 2008). Como consecuencia de esto, la actividad de Akt está constitutivamente elevada en células de CP y la terapia de eliminación de andrógenos eleva aún más dicha actividad. Martín-Orozco y colaboradores han demostrado el tratamiento con EGF (un ligando del receptor ErbB1) evita la adquisición de NED en células LNCaP por eliminación de andrógenos pero que dicho tratamiento en combinación con la inhibición de PI3K I por tratamiento con LY294002 induce NED. Este resultado sugiere que la inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt modula el efecto proliferativo de EGF hacia un efecto inductor de NED (Martín-Orozco et al. 2007). Un trabajo posterior de este mismo grupo de investigación demostró que la inducción de NED por tratamiento con EGF en combinación con LY294002, se correlacionaba con un aumento en la expresión y actividad de ErbB2 por un mecanismo independiente de la vía PI3K/Akt (Cortés et al. 2012).

La vía PI3K/Akt se encuentra en estrecha relación con la vía del receptor de andrógenos (Lin et al. 2001) y de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (De Luca et al. 2012), por lo cual se superpone estrechamente con la regulación de la supervivencia, progresión, metástasis y resistencia tumoral. En los últimos años se ha propuesto que en el CPRC se produce una compensación de la vía del AR por una activación de Akt/mTOR (Antonarakis et al. 2010; Floc'h & Abate-Shen 2012).

5.2. Quinasa dependiente de AMP

La quinasa dependiente de AMP (AMPK), es una serín/treonín quinasa que se encuentra presente en todas las células eucariotas en forma de complejo heterotrimérico compuesto por una subunidad catalítica α y dos subunidades reguladoras β y γ . En humanos y otros mamíferos, la subunidad α es codificada por dos genes (PRKAA1/PRKAA2 que codifican a $\alpha 1/\alpha 2$ respectivamente), la subunidad β por dos genes (PRKAB1/PRKAB2 que codifican a $\beta 1/\beta 2$ respectivamente) y la subunidad γ por tres genes (PRKAG1/PRKAG2/PRKAG3 que codifican a $\gamma 1/\gamma 2/\gamma 3$ respectivamente). De todas estas subunidades surgen 12 posibles combinaciones de subunidades α , β y γ para formar los heterotrimeros, aunque ciertas combinaciones se ven más favorecidas (Birk & Wojtaszewski 2006; Hardie 2007a; Towler & Hardie 2007). La subunidad α tiene su dominio catalítico en la región N-terminal, en tanto que para interactuar con las otras dos subunidades utiliza su extremo C-terminal (Hardie 2007b). La subunidad β es fundamental para el ensamblaje del heterotrimerio (Iseli et al. 2005) y posee en su región N-terminal un dominio de unión a glucógeno que se cree que permite a AMPK actuar sobre este tipo de partículas (Polekhina et al. 2003; Hudson et al. 2003). La subunidad γ posee cuatro repeticiones en tándem de motivos CBS (cistationina β sintasa), que funcionan como sitios de unión tanto para AMP como para ADP o ATP (Xiao et al. 2007; Xiao et al. 2011). La unión de AMP a la subunidad γ activa alostéricamente el dominio quinasa en la subunidad catalítica α . Además, AMP inhibe la defosforilación de la treonina 172 en el dominio quinasa de la subunidad catalítica α que es necesario para la activación de AMPK (Davies et al. 1995; Suter et al. 2006; Sanders et al. 2007a; Sanders et al. 2007b) (Figura 12).

AMPK actúa como un sensor energético que contribuye al mantenimiento del balance energético tanto a nivel celular como a nivel del organismo en condiciones de estrés metabólico en las que se produce una caída en los niveles de ATP. La disminución de ATP intracelular que resulta en un aumento de la relación AMP/ATP y AMP/ADP y activa a AMPK puede producirse por inhibición de la producción (hipoxia, eliminación de glucosa, tratamiento con biguanidas, xenobióticos) como por aceleración de su consumo (contracción muscular) (Hardie et al. 2016).

La fosforilación de AMPK en treonina 171 de la subunidad catalítica α se produce por las quinasas LKB1 (*Liver kinase B1*) (Hawley et al. 2003) y CaMKK β (*Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β*) (Woods et al. 2005) (Figura 12). LKB1 es la principal quinasa de AMPK y para ser activa conforma un heterotrimerio con STRAD (*STE20-related adaptor*) y MO25 (*mouse protein 25*). Diferentes líneas de investigación han demostrado que la fosforilación de la subunidad α dependiente de LKB1 se incrementa notablemente cuando AMP se une a la subunidad γ . Los estímulos que activan a LKB1 están principalmente relacionados con la alteración del metabolismo energético (Kahn et al. 2005; Kim et al. 2016). En oposición, el efecto de CaMKK β sobre AMPK se produce en respuesta a incrementos de Ca^{+2} independientemente de cambios en los niveles de AMP intracelular. Así, CaMKK β provee una vía alternativa de activación de AMPK principalmente relacionada con la regulación hormonal (Hattori et al. 2008).

Una vez activada, AMPK mantiene el balance energético inhibiendo procesos anabólicos y activando procesos catabólicos por fosforilación directa de enzimas metabólicas o de factores de transcripción y coactivadores (Steinberg 2009). Así, AMPK puede restringir el crecimiento celular mediante (i) inhibición de la síntesis proteica por fosforilación directa de TSC2 y raptor (regulador negativo y componente de mTORC1 respectivamente), (ii) bloqueo de la síntesis de ácidos grasos y colesterol por fosforilación directa de las enzimas ACC1 y HMGR e inhibición de los factores de transcripción SREBP y ChREBP), (iii) parada del ciclo celular y apoptosis a través de diversos mecanismos que incluyen estabilización de p53 y regulación de los inhibidores de CDKs p21^{Waf1} y p27^{Cip1} entre otros (Luo 2010).

Otro aspecto biológico importante de AMPK es el papel que desempeña en la autofagia, debido a que es capaz de fosforilar a dos de los componentes de la iniciación de la autofagia como son ULK1 (Kim et al. 2011a; Egan et al. 2011) y PI3K III (Kim & Guan 2013). Esto tiene especial relevancia en condiciones de estrés, como hipoxia y carencia de glucosa, en las que se produce una estimulación de la autofagia dependiente de AMPK (Meijer & Codogno 2007; Papandreou et al. 2008). Por otro lado, AMPK fosforila y estabiliza a p27^{kip1} lo que resulta suficiente para inducir autofagia (Liang et al. 2007). Sin embargo, la interconexión molecular entre AMPK y la autofagia tiene aún muchos aspectos desconocidos y es un campo prometedor donde expandir el conocimiento de la red funcional de AMPK en relación con la homeostasis metabólica (Figura 12).

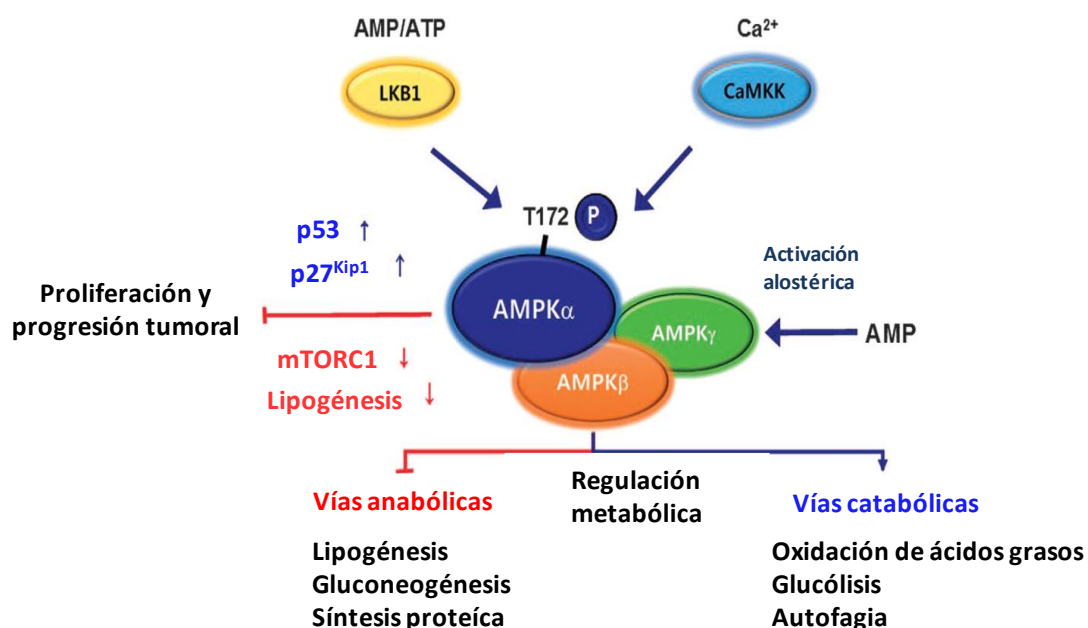


Figura 12. Procesos celulares en los que interviene la quinasa dependiente de AMP (AMPK). AMP: Adenosín monofosfato, ATP: Adenosín trifosfato. (Modificado de Kim et al. 2016).

Debido a su papel en la regulación de la homeostasis de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas, AMPK está involucrada en varias enfermedades, incluido el cáncer. A pesar de que la vía de activación de AMPK fue originalmente caracterizada como una cascada de señalización supresora de tumores, existe evidencia de que AMPK juega un papel bastante más complejo en cáncer y no es posible simplemente definirla como oncogénica o supresora de tumores (Kim 2015; Zadra et al. 2015).

En cáncer de próstata un cierto número de hallazgos determinan que AMPK promueve el crecimiento tumoral, mientras que otro número similar propone que tiene propiedades inhibitorias sobre el ciclo celular (Flavin et al. 2011). La pérdida de actividad de AMPK está relacionada con el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima en cáncer de próstata y mama, lo que sugiere que la actividad de AMPK es fundamental para contrarrestar la EMT relacionada con la invasión y metástasis tumoral (Chou et al. 2014). También, se ha demostrado que la proteína Akt fosforila AMPK en la serina 485, reduciendo su activación mediante LKB1 (Horman et al. 2006), lo cual tiene un importante connotación en tumores en los cuales se da hiperactivación de Akt por mutaciones con pérdida de función de PTEN o mutaciones activadoras de PI3K, como es el caso de la mayoría de los cánceres de próstata.

6. Cannabinoides

La planta de la marihuana o *Cannabis sativa* ha sido usada durante más de 5000 años con fines recreativos y medicinales. Los tratados de medicina china, que datan de varios siglos atrás, ya hacían referencia al uso de esta planta para el tratamiento del dolor como así también para producir estados alucinógenos (Felder & Glass 1998). Sin embargo el interés sobre la función fisiológica y la capacidad terapéutica de los cannabinoides ha cobrado importancia tan solo desde hace poco más de 50 años, a partir del aislamiento del delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), el más abundante de los cannabinoides presentes en la planta de la marihuana (Gaoni & Mechoulam 1964).

6.1. Sistema endocannabinoide

Cannabis sativa contiene tres tipos de moléculas bioactivas: flavonoides, terpenoides y alrededor de 70 tipos distintos de cannabinoides. Los cannabinoides son los principales componentes activos, siendo el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC) el más abundante. Como ya se ha comentado, a pesar de los usos tan variados de la marihuana, el descubrimiento de los receptores de cannabinoides y de sus ligandos endógenos ha tenido lugar hace pocas décadas atrás. El aislamiento del THC, estimuló la investigación para obtener un amplio rango de análogos sintéticos con propiedades similares a las del componente de la planta. Más de dos décadas después del descubrimiento del THC se identificaron los receptores de cannabinoides, CB1 (Devane et al. 1988; Matsuda et al. 1990) y CB2 (Munro et al. 1993). Entre estos dos hallazgos, se estableció la existencia de ligandos endógenos capaces de unirse a estos receptores, lo cual en conjunto actualmente se conoce como sistema endocannabinoide (Devane et al. 1992). El sistema endocannabinoide está constituido por cannabinoides endógenos (endocannabinoides), receptores de cannabinoides y enzimas capaces de la síntesis y degradación de los endocannabinoides.

El sistema endocannabinoide está implicado en un gran número de funciones fisiológicas, tanto a nivel del sistema nervioso como en distintos órganos. Debido a esta pléyade de funciones, la modulación de la actividad del sistema endocannabinoide es una prometedora herramienta terapéutica en el manejo de diversas y variadas enfermedades que van desde el Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis múltiple, obesidad y cáncer, entre otras (Bifulco & Di Marzo 2002; Pacher et al. 2006; Pisanti & Bifulco 2009).

6.2. Ligandos cannabinoides

El término cannabinoide hace referencia a un grupo de compuestos químicos que tienen la capacidad de activar a los receptores de cannabinoides. Según su origen pueden ser clasificados como: **endocannabinoides** (sintetizados en células de mamíferos), **fitocannabinoides** (sintetizados en la planta *Cannabis sativa*) y **cannabinoides sintéticos** (desarrollados mediante síntesis química) (Nikan et al. 2016).

6.2.1. Endocannabinoides

Los endocannabinoides son moléculas de naturaleza lipídica sintetizadas ubicuamente. Modulan distintas actividades celulares mediante la unión a receptores CB1 y CB2 en la mayor parte de los casos, aunque también se ha descrito que son capaces de realizar sus efectos mediante otros tipos de receptores. Los distintos tipos de endocannabinoides derivan de ácidos grasos de cadena larga poli insaturada unidos a etanolamina o glicerol. Entre los que se unen a etanolamina se encuentran el primer endocannabinoide descrito, anandamida (*N-araquidoniletanolamina*, AEA) y otros que han sido aislados más recientemente como *N-oleiletanolamida* (OEA) y *N-palmitoiletanolamida* (PEA). De los cannabinoides que se unen a glicerol se encuentran 2-araquidonil glicerol (2-AG) y 2-araquidonil gliceril éter (noladina, 2-AGE). Otros endocannabinoides descubiertos más recientemente incluyen a *N-homolinoleniletanolamina*, *O-araquidonil etanolamina* (virodamina), *N-dihomo γ -linoleniletanolamina*, *N-docosahexaenil etanolamida* (DHEA) y *eicosapentaenil etanolamida* (EPEA) (Díaz-Laviada 2011) (Figura 13).

La función de la mayoría de los endocannabinoides ha sido caracterizada principalmente en sistema nervioso central (Wilson & Nicoll 2002) en donde se sintetizan “a demanda” por las células postsinápticas, se liberan al espacio sináptico, se unen a las receptores de cannabinoides y actúan como neuromoduladores o mensajeros retrógrados (Hermanson & Marnett 2011; Lu & Mackie 2016).

6.2.2. Fitocannabinoides

De los aproximadamente 500 compuestos presentes en la planta *Cannabis sativa*, sólo unos 70 son considerados cannabinoides. Poseen una estructura tricíclica de 21C formada generalmente por tres anillos: ciclohexeno, tetrahidropirano y benceno. De todos ellos, el principal componente activo es el delta-9-tetrahidrocannabinol (THC), aunque en la planta están presentes en menor medida el cannabigerol (CBG), el cannabicromeno (CBC), el cannabidiol (CBD) y el cannabinol (CBN). Otros fitocannabinoides en estudio, por sus posibles propiedades terapéuticas, son el delta-9-Tetrahidrocannabivarin (THCV), el ácido delta-9-Tetrahidrocannabinólico (THCA) y el ácido cannabidiólico (CBDA) (EISOhly & Slade 2005; DeLong et al. 2010) (Figura 13).

6.2.3. Cannabinoides sintéticos

La síntesis química ha permitido la obtención de una gran variedad de cannabinoides sintéticos con diferente capacidad de unión a los receptores de cannabinoides, lo que supone una herramienta muy útil para el estudio del potencial terapéutico de estos compuestos. Se dividen en dos clases en función de su estructura: cannabinoides clásicos, que poseen una estructura parecida a la de los fitocannabinoides, y cannabinoides no clásicos que poseen una estructura química que

difiere altamente de la del THC (Castaneto et al. 2014). Dentro de éstos compuestos se encuentran tanto agonistas como antagonistas de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, o compuestos con afinidad más selectiva hacia uno de los dos tipos de receptores. El cannabinoide utilizado en esta tesis doctoral es R-(+)-WIN 55 212-2 (WIN), que se engloba dentro del grupo de cannabinoides sintéticos no clásicos y es un agonista no selectivo de CB1 y CB2. Los antagonistas sintéticos utilizados en esta tesis doctoral fueron SR141716 (SR1 o rimonabant) y SR144528 (SR2) que actúan como agonistas inversos de CB1 y CB2 respectivamente y su unión al receptor cannabinoide bloquea totalmente la activación inducida por un agonista (Pertwee et al. 2010) (Figura13).

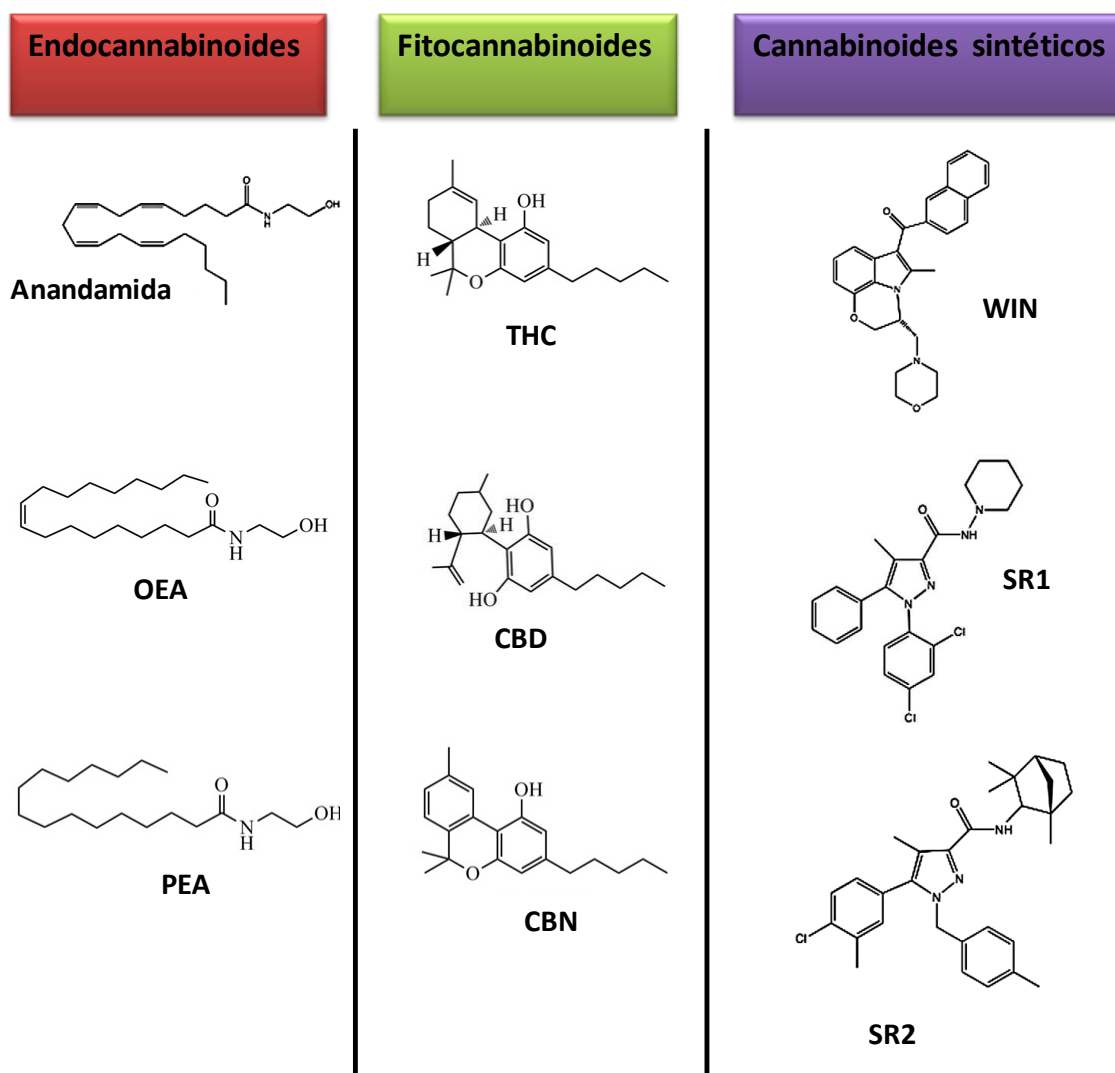


Figura 13. Clasificación de los cannabinoides según su origen.

6.3. Receptores de cannabinoides

Debido a que el THC es altamente lipofílico, posteriormente a su descubrimiento y purificación se pensó que ejercía sus efectos a través de interacciones que estimulaban o inhibían enzimas asociadas a la membrana plasmática y/o alterando el estado de canales iónicos (Hillard et al. 1985; Martin 1986). Actualmente, se sabe que los cannabinoides actúan a través de la unión a varios receptores, de los cuales CB1 y CB2 son los mayoritarios (Figura 14).

Los receptores CB1 y CB2 son miembros de la superfamilia de receptores con siete pasos transmembrana acoplados a proteínas G (GPCR) y entre ellos hay un alto grado de similitud. CB1 y CB2 han sido clonados y caracterizados a partir de tejidos de mamíferos y la principal diferencia entre ellos radica en su cola citoplasmática y su patrón de expresión. CB1 se denominó originalmente “receptor central” y CB2 se denominó “receptor periférico”, pero actualmente se sabe que ambos puede tener una distribución bastante más amplia (Alexander et al. 2009).

El receptor CB1 tiene una localización ubicua, aunque preferente en sistema nervioso central (ganglios basales, hipocampo, cerebelo y corteza) donde desencadena principalmente efectos psicoactivos. Pese a que se caracterizó como un receptor de sistema nervioso ha sido detectado en testículo, útero, endotelio vascular, bazo y adipocitos (Mackie 2005). Si bien el receptor CB2 clásicamente ha sido considerado de expresión restringida a células y órganos del sistema inmune (linfocitos B y bazo) en donde no se relaciona con el desencadenamiento de efectos psicoactivos (Galiègue et al. 1995; Felder & Glass 1998; Howlett et al. 2002), también se ha visto que se expresa en sistema gastrointestinal, hueso, tejido adiposo, en diversas zonas de tracto genital como así también se expresa en células tumorales (Guzmán 2003; Pacher et al. 2006; Sarfaraz et al. 2008; Greineisen & Turner 2010; Díaz-Laviada 2011; Pertwee 2012). Además, el receptor CB2 se expresa en sistema nervioso central y periférico donde modula la liberación de neurotransmisores (Morgan et al. 2009).

Ambos tipos de receptores de cannabinoides ejercen sus efectos biológicos estimulando la transducción de señales a través de proteínas Gi/o, pudiendo también activar Gs y Gq/11 (Sharma et al. 2015). Este acoplamiento conduce a una inhibición de la actividad de múltiples efectores entre los que destaca la adenilil ciclasa (AC). El receptor CB1 también puede inhibir varios canales iónicos, entre ellos de calcio, potasio y sodio. Los distintos miembros de la familia MAPK pueden ser activados por los dos receptores de cannabinoides a través de PI-K de clase I, regulando así el crecimiento celular (Howlett 2005; Turu & Hunyady 2010; Bosier et al. 2010). Además, también pueden regular los niveles de calcio intracelular mediante la activación de fosfolipasa C (PLC), metabolismo del ácido araquidónico, síntesis de ceramida y producción de óxido nítrico. Asimismo, pueden regular la transcripción por medio de distintos factores de transcripción, entre ellos c-Fos, Kros-24 y NFκB (Díaz-Laviada & Ruiz-Llorente 2005; Pacher et al. 2006; Dalton et al. 2009) (Figura 14).

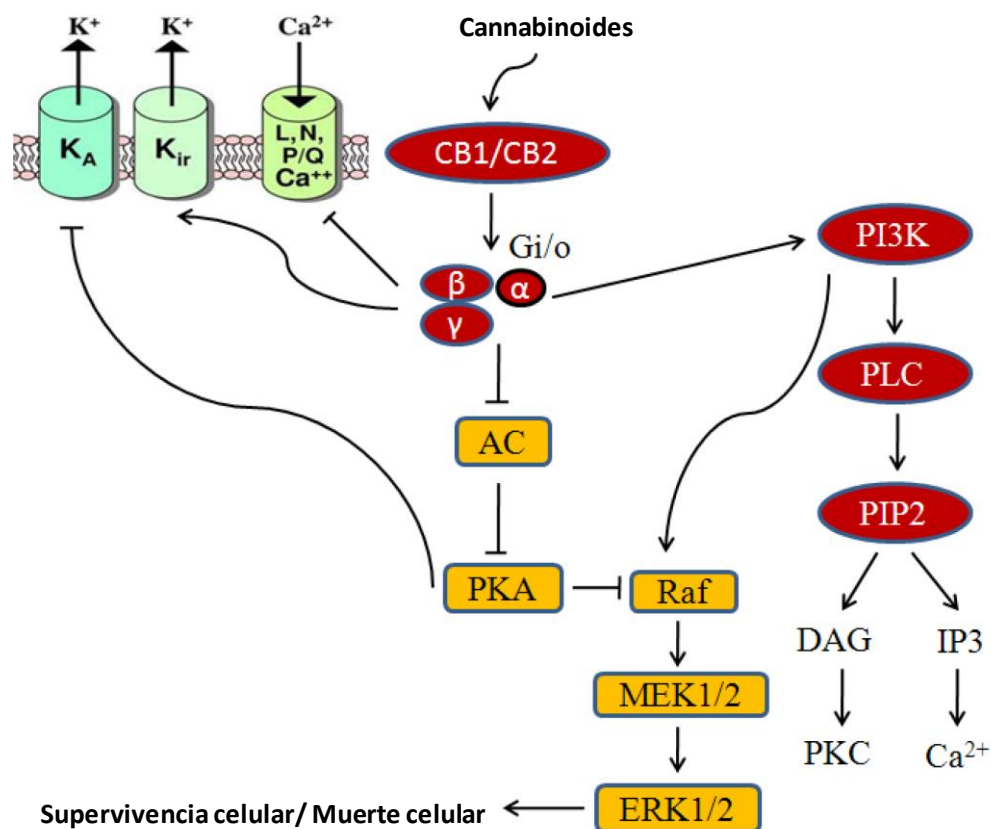


Figura 14. La activación de los receptores CB1 y CB2 mediante los cannabinoides modula diversas cascadas de señalización, que en última instancia, controlan el balance entre supervivencia y muerte celular. AC (adenilil ciclasa), DAG (diacilglicerol), PLC (fosfolipasa C), PKA (proteína quinasa A), PKC (proteína quinasa C). (Modificado de Chakravarti et al. 2014).

6.4. Cannabinoides y cáncer

Los cannabinoides han sido utilizados con éxito en el tratamiento de los efectos secundarios que acompañan a la terapia del cáncer como son dolor, náuseas, vómitos y pérdida de apetito y de peso. Pese a ser utilizados como tratamiento paliativo de los efectos de la quimioterapia y radioterapia, aún no son utilizados como agentes antitumorales en la práctica clínica. La primera evidencia del efecto antitumoral de los cannabinoides data del año 1975 cuando Munson y colaboradores demostraron que el THC tenía efecto inhibitorio del crecimiento en células de cáncer de pulmón por administración oral en ratones (Munson et al. 1975). Desde entonces un creciente volumen de trabajo científico ha demostrado que estos compuestos tienen efecto antiproliferativo, antiangiogénico, antimetastásico y proapoptótico en varios tipos de cánceres que incluyen cáncer de pulmón, tiroides, piel, útero, mama, páncreas, próstata, hígado, glioma y linfoma tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* (Galve-Roperh et al. 2000; Sánchez et al. 2001; Blázquez et al. 2006; Bifulco et al. 2008; Sarfaraz et al. 2008; Olea-Herrero et al. 2009a; Salazar et al. 2009; Guindon & Hohmann 2011; Vara et al. 2011; Hermanson & Marnett 2011; Chakravarti et al. 2014; Velasco et al. 2016; Morell et al. 2016).

A pesar de las múltiples evidencias preclínicas existentes sobre el uso terapéutico de los cannabinoides como agentes antitumorales, hasta la fecha sólo existe un ensayo en fase clínica I aprobado por el Ministerio Español de Sanidad en 2002 (Guzmán et al. 2006). El objetivo de este estudio fue evaluar la administración intratumoral de THC en pacientes con glioblastoma multiforme recurrente, un tumor primario muy agresivo de pobre pronóstico. Se encontró que la administración intracraneal de THC era segura y no presentaba efectos psicoactivos, disminuyó la proliferación celular del tumor e indujo apoptosis, pero tuvo un tenue impacto sobre la media de supervivencia de estos pacientes (Alexander et al. 2009; Pisanti & Bifulco 2009).

6.5. Cannabinoides y cáncer de próstata

Pese a que la biosíntesis de endocannabinoides en el tejido prostático no ha sido demostrada *in vivo*, son muchas las evidencias que sugieren la importancia que tiene el sistema endocannabinoide en la fisiología prostática (Díaz-Laviada 2011).

Los receptores de cannabinoides han sido localizados en la próstata humana así como en biopsias de pacientes con BPH y CP. Se ha descrito que CB1 se localiza en las neuronas aferentes parasimpáticas, en las células epiteliales y en las células neuroendocrinas donde participaría en la regulación de la actividad secretora prostática (Ruiz-Llorente et al. 2003; Tokanovic et al. 2007; Chung et al. 2009; Gratzke et al. 2010). La mayoría de las enzimas que intervienen en el metabolismo del sistema endocannabinoide se han localizado en la próstata y en células de cáncer de próstata LNCaP, PC-3 y DU145. Más aún, ciertos endocannabinoides como AEA, PEA y OEA han sido detectados en el fluido seminal donde se cree que podrían estar relacionados con la regulación de la capacidad de fertilización de los espermatozoides (Schuel et al. 2002; Nithipatikom et al. 2004; Endsley et al. 2007).

La localización en la próstata, tanto en células epiteliales como nerviosas, de los receptores de cannabinoides ha dado soporte a la idea de que los endocannabinoides podrían estar interviniendo en una vía de señalización de tipo neuroendocrina. Así pues, la desregulación del sistema endocannabinoide ha cobrado importancia en la investigación del desarrollo del cáncer de próstata. Sarfaraz y colaboradores describieron, por primera vez, que se produce un aumento en la expresión de CB1 en células de CP con respecto a células prostáticas normales (Sarfaraz et al. 2005).

En muchos tipos de cánceres se produce un aumento de la expresión de CB2 (Patel et al. 2010). Se ha demostrado que las células de cáncer de próstata LNCaP, PC-3 y DU145 expresan altos niveles de CB2 y que la activación de este receptor mediante el cannabinoide JWH-015 induce parada del ciclo celular y apoptosis (Ruiz-Llorente et al. 2003; Nithipatikom et al. 2004; Olea-Herrero et al. 2009a). Así, en conjunto, la evidencia de que el sistema endocannabinoide juega un importante papel en la patología tumoral prostática hace que sea necesario seguir investigando los posibles efectos del tratamiento con cannabinoides de células de CP y establecer los mecanismos celulares que se desencadenan como consecuencia de los mismos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La mayoría de tumores de próstata aparecen en forma de adenocarcinoma cuyo desarrollo y progresión depende de los andrógenos. Por ello, la estrategia terapéutica convencional está encaminada a bloquear la síntesis de andrógenos endógenos y/o inhibir la función del receptor de andrógenos. La terapia de eliminación de andrógenos (ADT) raramente erradica todas las células tumorales y, con el tiempo, los pacientes desarrollan resistencia a este tratamiento apareciendo así el cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). En algunos casos, este tipo de cáncer resistente evoluciona hacia un subtipo muy agresivo con fenotipo neuroendocrino o diferenciación neuroendocrina (NED) para el que la supervivencia es de aproximadamente 1 año. Conocer los mecanismos moleculares que permiten la aparición de las células neuroendocrinas (NE) y, sobre todo, determinar los procesos que permiten su supervivencia y su biología es de crucial importancia para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que permitan combatir este tipo de cáncer tan letal. Por ello, en este trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Validar un modelo celular de NED generado mediante el cultivo de células de cáncer de próstata LNCaP en un medio carente de suero.
2. Evaluar el efecto que las células NE ejercen sobre el crecimiento y capacidad tumoral de las células de cáncer de próstata.
3. Analizar las vías de señalización que sustentan la NED de las células LNCaP.
4. Estudiar el papel de la autofagia y de la proteína lisosomal LAMP2 en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata.
5. Estudiar el papel del cannabinoide sintético WIN 55-212-2 en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales y reactivos

1.1. Materiales empleados en cultivos celulares

Los materiales empleados en la realización de cultivos celulares fueron los siguientes:

- Placas y frascos de cultivo, de dos marcas comerciales: Falcon® Becton Dickinson Labware (New Jersey, USA) y Nunc™ Brand Products (Roskilde, Dinamarca).
- Medio RPMI-1640 con L-glutamina estéril de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Suero bovino fetal de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Solución de antibiótico (penicilina G 100 UI/ml, sulfato de estreptomicina 100 µg/ml y anfotericina B 0,25 µg/ml) de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Solución de tripsina de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).

1.2. Reactivos empleados en la elaboración de tampones

- Aprotinina, leupeptina, inhibidor de tripsina de soja (STI), azida sódica, azul de bromofenol, bromuro de etidio, dimetil sulfóxido (DMSO), glicina, trietanolamina (TDA), leupeptina, β-mercaptoetanol, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y Tween 20, provienen de Sigma (St. Louis, MO, USA).
- Glicerol, CaCl_2 , MgCl_2 , KCl, EDTA, EGTA, KCl, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , Na_3VO_4 , NaF, Tris y dodecil sulfato sódico (SDS) provienen de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Etanol, isopropanol y metanol proviene de Panreac (Barcelona, España).

1.3. Agonistas, antagonistas, activadores e inhibidores

El cannabinoide WIN 55, 212-2 (WIN) procede de Sigma (St. Louis, MO, USA). Los antagonistas de los receptores de cannabinoides CB1 y CB2, SR 141716 (SR1) y SR 144528 (SR2) respectivamente, provienen de Sanofi Recherche (Montpellier, Francia). Bafilomicina A1 y 3-metiladenina proceden de Sigma (St. Louis, MO, USA). El inhibidor de Akt IV y rapamicina se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, USA). Tanto AICAR como LY294002 se obtuvieron de Tocris (Bristol, UK).

2. Métodos

2.1. Cultivos celulares

Se utilizaron dos líneas celulares tumorales epiteliales de próstata humana: LNCaP clon FGR (ATCC Nº CRL-1740) y PC-3 (ATCC Nº CRL-1435) que fueron obtenidas de ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). La línea LNCaP proviene de una metástasis a un ganglio linfático de un carcinoma prostático y responde a andrógenos. La línea PC-3 deriva de una metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata de grado IV y es insensible a andrógenos.

Las células se descongelaron en pases bajos, se sembraron en frascos de cultivo y se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (fetal bovine serum, FBS) en presencia de 1% de solución de antibiótico, a 37°C en un ambiente húmedo y con un 5% de CO₂. El medio se cambió dos veces por semana y cuando las células llegaron a un 70-90% de confluencia se lavaron con PBS, se les añadió 3 ml de tripsina/EDTA para levantarlas, se recogieron con 6 ml de medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS y se volvieron a sembrar.

Para los experimentos con las células LNCaP, estas se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² y después de 48 horas se cambió el medio. Las células LNCaP se cultivaron con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS durante 6 días (control, C), en tanto que para la NED las células se cultivaron con medio RPMI-1640 sin suero durante 2, 4 y 6 días (NE).

Para los experimentos con las células PC-3, estas se sembraron a una densidad de 5.000 células/cm² y después de 48 horas se cambió el medio según las condiciones del experimento. Las células PC-3 se cultivaron con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de FBS durante 6 días (C), con RPMI-1640 sin suero (Vhc) o con una combinación de RPMI-1640 sin suero + sobrenadante de células NE (Sbte NE) durante 2, 4 y 6 días. El sobrenadante de células NE se obtuvo centrifugando y filtrando el medio de LNCaP incubadas con medio sin suero durante 6 días.

Para los experimentos de co-cultivos de células LNCaP y PC-3, las células se sembraron juntas a una densidad final de 5.000 células/cm² en ausencia de suero durante 2, 4 y 6 días.

2.2. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo colorimétrico

La viabilidad celular se determinó mediante un método colorimétrico que consiste en analizar la actividad metabólica de las células valorando su capacidad para reducir la sal de tetrazolio MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazol) procedente de Sigma (St. Louis, MO, USA), a un complejo formazán de color azul oscuro producido por las deshidrogenasas mitocondriales en las células vivas. Las células control (día 0) y las células cultivadas sin suero (-FBS) a distintos tiempos y con

los distintos tratamientos se incubaron con 0,5 mg/ml de MTT durante 1h a 37°C en oscuridad. Los cristales de formazán formados se solubilizaron con isopropanol, se agitaron suavemente las placas para obtener una coloración homogénea y se valoró la diferencia de absorbancias a 570 nm y a 630 nm con un espectrofotómetro de placas (ELX 800 Bio-Tek Instruments, INC). La absorbancia obtenida en las células control (día 0), según el experimento, se consideró el 100% de viabilidad y la viabilidad se determinó por comparación con respecto a este dato.

2.3. Obtención de extractos celulares

Para la obtención de proteínas totales, las células se levantaron de la placa con tampón de homogenización (Tris-HCl 50 mM pH=7,4, Tritón X100 20%, Na₃VO₄ 1 mM, β-glicerofosfato 10 mM, EDTA 5 mM, EGTA 1mM, NaF 50 mM, leupeptina 2 µg/ml, aprotinina 10 µg/ml, PMSF 0,1 mM) mediante raspado en hielo. Posteriormente, las muestras recogidas se dejaron a 4°C durante 30 minutos. Inmediatamente después se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, recogiendo el sobrenadante que se guardó a -80°C hasta su utilización.

2.4. Separación de fracción particulada y soluble de células en cultivo

Para la obtención de la fracción particulada y soluble de proteínas, las células se levantaron de la placa con tampón de homogeneización sin Tritón X100 20% mediante raspado en hielo. Posteriormente se procedió a la ruptura de la membrana celular por sonicación en un sonicador de punta de BRANSON Sonic Power Company (Rochester, NY, USA). Inmediatamente después, las muestras fueron centrifugadas a 49.000x durante 1 hora a 4 °C y se recogió, por una parte el sobrenadante (que se consideró a la fracción soluble) y por otra el sedimento (que se consideró la fracción particulada). El sedimento se solubilizó en tampón de homogeneización con Tritón X100 20%.

2.5. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el método de Bradford (Bradford 1976) utilizando un reactivo comercial de BioRad (Richmond, CA, USA) y una curva estándar de 1-4 µg/µl de solución de albúmina de suero bovina (BSA) de la casa comercial Sigma (St. Louis, MO, USA).

2.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunodetección de proteínas

Se pipetearon 10-30 µg de proteínas de las diferentes fracciones y se sometieron las muestras a desnaturalización por calor a 95 °C durante 5 minutos en un tampón de carga SBL [(tampón de muestra Laemmli) (Tris-HCl 0,0125 M pH=6,8, SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 1%, azul de bromofenol 0,005%)]. Las muestras se cargaron en geles al 8, 10 ó 15% de acrilamida/bisacrilamida de BioRad (Richmond, CA, USA), dependiendo de la proteína que se quisiera detectar. La separación electroforética se realizó en condiciones desnaturalizantes (*polyacrylamide gel electrophoresis*, PAGE) de tipo vertical en un sistema de BioRad (Richmond, CA, USA) a temperatura ambiente durante aproximadamente 90 minutos. El tampón de electroforesis que se utilizó estaba compuesto por Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 0,2 M y SDS 0,1%. Se utilizaron marcadores de peso molecular de la casa comercial Lonza (Basilea, Suiza).

Tras la separación electroforética, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (disulfuro de polivinilo) de BioRad (Richmond, CA, USA), mediante la aplicación de un campo eléctrico de 100 V durante 2 horas en tampón de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH=8,3, glicina 192 mM y metanol 20%) a 4 °C.

Finalizada la transferencia, las membranas se lavaron durante 10 minutos con tampón TBS-Tween 20 al 0,1% [(tampón Tris salino, TBS) Tris-HCl 50 mM pH=7,6, NaCl 100 mM] a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario específico de la proteína objeto de estudio, diluido con tampón TBS-Tween 20 al 1%, durante toda la noche a 4 °C. Tras esta incubación, se realizaron dos lavados rápidos de las membranas con TBS-Tween 20 al 0,1%. A continuación, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, conjugado con peroxidasa de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP), diluido en TBS-Tween 20 al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con el mismo tampón en que se diluyó el anticuerpo secundario. Por último se procedió al revelado de la señal utilizando un reactivo ECL (Tris-HCl 10 mM pH=8,3, luminol 1,25 mM, p-cumárico 0,2 mM, H₂O₂ 0,01%) durante 3 minutos. La luz emitida por la reacción (proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la membrana) se detectó mediante una corta exposición a películas radiográficas *Curix RP2 Plus* de Agfa (Mortsel, Bélgica). El análisis densitométrico de las bandas obtenidas en las placas fotográficas se realizó con el programa Scion Image (Scion Corporation, Maryland, USA).

Los distintos anticuerpos primarios utilizados se detallan en la tabla 2. Como anticuerpos secundarios se utilizaron IgG anti-ratón conjugado con HRP de Sigma (St. Louis, USA) e IgG anti-conejo conjugado con HRP de Calbiochem (La Jolla, USA).

Anticuerpo	Especie	Casa comercial
ACC	Conejo	Cell Signaling
pACC (Ser 79)	Conejo	Cell Signaling
Akt	Conejo	Cell Signaling
pAkt (Ser 473)	Conejo	Cell Signaling
AMPK α 1	Conejo	Cell Signaling
pAMPK α 1 (Thr172)	Conejo	Cell Signaling
Atg5	Conejo	Cell Signaling
β III-tubulina	Conejo	Covance
CB2	Conejo	Affinity BioReagents
NSE	Ratón	DAKO
GAPDH	Conejo	Cell Signaling
LC3	Conejo	Novus
LAMP2	Ratón	ABCAM
mTOR	Conejo	Cell Signaling
pmTOR	Conejo	Cell Signaling
p62	Conejo	Cell Signaling
S6	Ratón	Cell signaling
pS6(Ser 235/236)	Conejo	Cell signaling
P70S6K	Conejo	Cell signaling
pP70S6K (Thr389)	Ratón	Cell signaling

Tabla 2. Anticuerpos primarios.

2.7. Inmunocitoquímica

Para la realización de esta técnica las células se sembraron sobre cubreobjetos de cristal colocados en las placas de cultivo. En los experimentos para analizar la localización subcelular de LAMP2 se utilizó la sonda fluorescente LysoTracker® Red DND-99 de Invitrogen (Paisley, UK). La sonda se añadió a los cultivos 30 minutos antes de finalizar el experimento a una dosis final de 50 nM. Al finalizar los tratamientos, las células se lavaron con PBS [(tampón fosfato salino, PBS) NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ · 7H₂O 4,3 mM, KH₂PO₄ 1,4 mM pH=7,8) y se fijaron con p-formaldehído 4% de Sigma (St. Louis, MO, USA) durante 20 a 30 minutos. Para permeabilizar la membrana celular se utilizó tampón PBS-Tritón X100 0,5%. Posteriormente las células se incubaron con el anticuerpo primario específico de la proteína en estudio diluido en tampón PBS-Tritón X100 0,1% durante una hora a temperatura ambiente. Pasado este tiempo los cristales se lavaron tres veces con tampón PBS-Tritón X100 0,1% y se incubaron con una dilución que contenía: anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 o con Texas Red (Invitrogen, Paisley, UK) y fluorocromo DAPI 1µg/ml de Calbiochem (La Jolla, USA) durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente se lavaron nuevamente tres veces con tampón PBS-Tritón X100 0,1%, se pegaron a un portaobjeto utilizando solución de montaje (Tris-HCl 0,1M pH=8,5, Mowiol 2,4%, glicerol 20%). Las preparaciones se analizaron mediante observación en un microscopio confocal de fluorescencia Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

2.8. Silenciamiento con ARN de interferencia

Para la inhibición de la expresión de determinadas proteínas se utilizó la técnica del silenciamiento con ARN de interferencia (siARN).

Para la realización de estos experimentos las células se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Dos días después se procedió a realizar la transfección con los siARNs correspondientes. Primero se diluyeron los oligonucleótidos del gen específico que se quiso silenciar en medio Optimen (Invitrogen, Paisley, UK) y posteriormente se añadió una solución de Optimen más Lipofectamina RNAi MAX (Invitrogen, Paisley, UK) y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células dos veces con PBS se les añadió la mezcla de transfección con una concentración final de siARNs de 100 nM. Las células se incubaron con los siARNs en estufa a 37°C y 5% CO₂ durante 72 horas, se recordó el silenciamiento en las mismas condiciones por 72 horas más.

Los siARN utilizados fueron sintetizados *in vitro* empleando el sistema de construcción Invitrogen (Paisley, UK). Se comprobó en la base de datos del genoma humano mediante el programa BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov), que los oligonucleótidos prediseñados no afectaban a otros genes del genoma. En la tabla 3 se recogen las secuencias de oligonucleótidos diseñados contra AMPK, Atg5, IL-6 y

LAMP2. Como control de las transfecciones se utilizó siARNs con la misma secuencia del siARN pero con las bases desordenadas (scrambled). En este caso también se comprobó mediante el programa BLAST que no afectaba a ningún gen del genoma humano.

Proteína	Sentido 5´-3´	Antisentido 5´-3´
AMPK	CCCAUUAUUUUGCGUGUAdTdT	UACACGCAAAUAAUAUGGGdTdT
Atg5	GUGAGAUUUGGUUUGAAUAdTdT	UAUUCAACCAUAUCUCAC dTdT
IL-6	GAACGAAUUGACAAACAAAdTdT	UUUGUUUGUCAAUUCGUUdTdT
LAMP2	GUCUGUGCGGUCUUAUGCAUdTdT	AUGCAUAAGACCGCACAGCdTdT

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos.

2.9. Aislamiento de ARN

La extracción de ARN de las células se realizó con el kit comercial TriReagent® (Molecular Research Center, Ohio, USA). Tras los distintos tiempos de tratamiento de las células, se retiró el medio y se añadió 0,5 ml del preparado comercial por cada placa de cultivo. El lisado resultante se pasó a un tubo de 1,5 ml al que se añadió 0,1 ml BCP (1-bromo-3-cloropropano). Tras agitar durante 15 segundos se dejó a temperatura ambiente durante 5 minutos. La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4º C. Se separó la fase acuosa (fase superior donde se encuentra el ARN), se precipitó el ARN presente en dicha fase añadiendo 0,5 ml de isopropanol y se dejó durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, y luego 30 minutos a -20ºC. Posteriormente se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 minutos a 4º C. El precipitado se lavó con etanol al 75% y se volvió a centrifugar a 7.500 rpm durante 5 minutos a 4º C. Finalmente para quitar todo resto de etanol que quedase el precipitado se secó en baño seco a 60ºC durante 10 minutos y se resuspendió con agua MilliQ recién obtenida, libre de pirógenos y ARNasas.

A continuación se determinó la cantidad y la calidad del ARN midiendo la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm en fotómetro Nanodrop® (Wilmington, USA). Para el cálculo de la concentración de ARN se consideró que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 40 µg/ml de ARN. Para ver el grado de pureza del ARN extraído, se midió la absorbancia a 280 nm y se calculó la relación 260/280, que indica el grado de pureza del ARN; solo se utilizaron las muestras con relaciones superiores a 1,8.

2.10. Retrotranscripción de ARN

Se realizó la retrotranscripción con 2 µg de ARN mensajero, al que se añadieron 2 µl de cebadores OligodT (Promega, Madison, USA) llevándose la mezcla a un volumen final de 12,2 µl con agua MilliQ recién obtenida. Se incubaron las muestras a 65°C durante 10 minutos y luego se enfriaron a 4°C, para eliminar posibles estructuras secundarias negativas para la reacción. Posteriormente se añadió la mezcla de retrotranscripción formada por: 4 µl tampón de reacción (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania), 1 µl de dNTPs de un stock de 20mM (Promega, Madison, USA), 0,5 µl de inhibidor de ARNasa de un stock de 40 U/µl (Promega, Madison, USA), 0,3 µl de retrotranscriptasa de un stock de 200 U/µl (Roche Applied Science).

El volumen final de la reacción fue de 20 µl y se llevó a cabo en un termociclador (AB 7500 Fast, Applied Biosciences) programado a 25°C durante 10 minutos y a 60°C durante una hora dejándose durante 5 minutos a 80°C para que se inactivara la enzima. Por último se cuantificó la cantidad de ADNc sintetizado en el fotómetro Nanodrop® (Wilmington, USA).

2.11. PCR cuantitativa a tiempo real

La PCR cuantitativa a tiempo real (q-PCR) se realizó por el método de SYBR Green® (Applied Biosystems, Foster City, USA). Las cantidades usadas de ADNc y de cebadores para llevar a cabo la reacción fueron calculadas previamente mediante curvas de eficiencia con cantidades crecientes de ambos reactivos, para asegurar que en cada ciclo de PCR la cantidad ADNc se duplicara.

La amplificación se realizó en termociclador (AB 7500 Fast, Applied Biosciences) programado con las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 segundos, 40 ciclos de 94 °C 3 segundos, 60 °C 40 segundos, 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 1 minutos, 95 °C durante 15 segundos. La cuantificación relativa de los genes de interés se calculó usando el método de comparación de los valores Ct (ciclo umbral), dónde Ct se define como el número de ciclo a partir del cual el producto es detectado por fluorescencia o ciclo a partir del cual comienza la amplificación de manera exponencial. Para ello se usó la siguiente fórmula: $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$, siendo $\Delta\Delta Ct$ igual a ΔCt muestra problema menos ΔCt muestra control y ΔCt , la diferencia entre Ct obtenido en la amplificación del gen objeto de estudio en la muestra y un gen constitutivo de la misma muestra frente al cuál se normaliza la cuantificación, en este caso el gen de GAPDH. Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la tabla 4:

Gen	Sentido 5'-3'	Antisentido 5'-3'
ENO2	GGCTACACGGAAAAGATCGTTATT	GAAGGATCAGTGGGAGACTTGAA
LAMP2	TGCTGGCTACCATGGGGCTG	GCAGCTGCCTGTGGAGTGAGT
LC3	TGTCCGACTTATTCGAGAGCAGCA	TTCACCAACAGGAAGAAGGCCTGA
Atg1	CAGACGACTTCG TCATGGTC	AGCTCCCACTGCACATCAG
Atg5	CAACTTGTT TCACGCTATATCAGG	CACTTTGTCAGTTACCAACGTCA
CB1	CATTAAGACGGTGTTCATTCT	CGTGTCGCAGGTCCTTACTC
CB2	GACACGGACCCCTTTTGCT	CCTCGTGGCCCTACCTATCC
IL-6	CAAAGATGGCTGAAAAGATGGA	CTGTTCTGGAGGTACTCTAGGT
GADPH	GGGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCC	CATGTGGCCATGAGGTCCACCAC

Tabla 4. Secuencias de oligonucleótidos.

2.12. Determinación de niveles de IL-6

La cuantificación de los niveles de interleuquina 6 (IL-6) fue realizada en los sobrenadantes de las células en cultivo por ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) tipo “sandwich”, siguiendo las instrucciones del fabricante (Diaclon Recherche, Besançon, Francia). Se incubaron los sobrenadantes celulares durante una hora en una placa de 96 pocillos cubierta con anticuerpo anti-proteína IL-6 humana y posteriormente con el anticuerpo correspondiente biotinilado a temperatura ambiente. Se lavó la placa con tampón de lavado y se incubó con la enzima HRP conjugada con estreptavidina durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las placas y se incubaron con el sustrato de HRP, TMB (3, 3',5',5'- tetrametilbenzidina) durante 10 minutos. La reacción se detuvo al añadir H₂SO₄ 1M, y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas (ELX 800 Bio-Tek Instruments, INC).

En algunos de los ensayos se empleó IL-6 humana recombinante procedente de Peprotech (Paris, Francia).

2.13. Experimentación animal

2.13.1. Animales

Se utilizaron ratones macho atímicos nu/nu (BALB/cOlaHsd-Foxn1nu) de seis semanas de edad (Harlan Ibérica, Barcelona, España). Al no poseer timo o ser éste rudimentario, estos animales tienen una deficiencia de células T (Pantelouris 1968) presentando una falta de respuesta inmune dependiente del timo, lo que permite que puedan ser receptores de tumores humanos. Estos animales fueron mantenidos en una zona de cuarentena en el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá, con ciclos constantes de luz/oscuridad de 12 h. Los estudios fueron realizados en concordancia con la regulación española para el uso y cuidados de los animales de experimentación (Real Decreto 53/2013) y en el marco de un proyecto autorizado por el comité de ética de la Universidad de Alcalá y por la Comunidad de Madrid (PROEX 241/15).

2.13.2. Inducción de tumores

Después de un periodo de adaptación de una semana, a los ratones se les inyectó subcutáneamente en el flanco derecho, 0,1 ml de tampón PBS+0,5% de BSA conteniendo 5×10^6 células PC-3, una mezcla de células PC-3 y LNCaP o una mezcla células PC-3 y células neuroendocrinas para inducir tumores. Aproximadamente a las 4 semanas los tumores alcanzaron un tamaño de 100 mm^3 . Los ratones fueron divididos en 2 grupos experimentales con 4 animales cada uno, y recibieron diariamente con inyección subcutánea de manera peritumoral los correspondientes tratamientos (vehículo, 0,5 mg/kg de WIN55, 212-2 ó 1,5 mg/kg de WIN55, 212-2). El tamaño de tumor (que se calcula con la fórmula $0,523 \times A^2 \times L$; siendo A el ancho del tumor y L la longitud del mismo) fue controlado y calculado a diario mediante el uso de un calibrador. Tras quince días de tratamiento los animales fueron sacrificados, se extrajeron los tumores y se obtuvo el suero. Los tumores fueron homogeneizados en tampón de lisis y las proteínas obtenidas se cuantificaron para la inmunodetección.

2.14. Análisis estadístico

El análisis estadístico de todos los datos se realizó con el programa informático GraphPad Prism de GraphPad Software Inc. Los valores están indicados como la media \pm desviación estándar (D.E.) o el coeficiente de variación (C.V.) dependiendo de los ensayos. El análisis estadístico se realizó mediante la *t de Student*, al comparar dos valores entre los que sólo varía un parámetro y el resultado se consideró significativo cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Modelo celular de diferenciación neuroendocrina mediante retirada de suero del medio de cultivo.

El primer paso experimental de esta tesis doctoral consistió en establecer un modelo celular de diferenciación neuroendocrina (NED) en células de cáncer de próstata LNCaP. La inducción de NED *in vitro* en células de cáncer de próstata LNCaP se puede generar mediante diferentes estrategias, entre ellas la eliminación de andrógenos del medio de cultivo. Dicha estrategia puede ser realizada por eliminación del suero del medio de cultivo y fue la utilizada en este trabajo.

En primer lugar se analizó la cinética de la diferenciación neuroendocrina mediante eliminación de suero durante 2, 4 y 6 días para evidenciar los cambios morfológicos que se producen en el fenómeno de NED. En las células cultivadas sin suero (-FBS) van apareciendo prolongaciones denominadas neuritas que tienen una longitud bastante variable y en las zonas de mayor densidad celular del cultivo permiten el contacto entre ellas. Este fenómeno morfológico es más evidente a los 6 días de eliminación de suero cuando las células LNCaP se han convertido ya en células neuroendocrinas (NE) (Figura 15A). Las células se consideran neuroendocrinas cuando la longitud de las prolongaciones supera al doble del diámetro del cuerpo celular. A los 6 días de cultivo sin suero la mayoría de las células se encuentran en este estado (Figura 15B).

Las células neuroendocrinas en el cáncer de próstata no son proliferativas (Shen et al. 1997; Yuan et al. 2007). Para demostrar esta característica en nuestro modelo celular de NED se midió la viabilidad celular mediante ensayo MTT. En la figura 16 se observa que la eliminación de suero impide el aumento del número de células metabólicamente activas. Esto puede ser considerado como una parada en el crecimiento celular, mientras que las células cultivadas durante el mismo tiempo en presencia de suero muestran un aumento de las células metabólicamente activas, por lo que se considera que crecen.

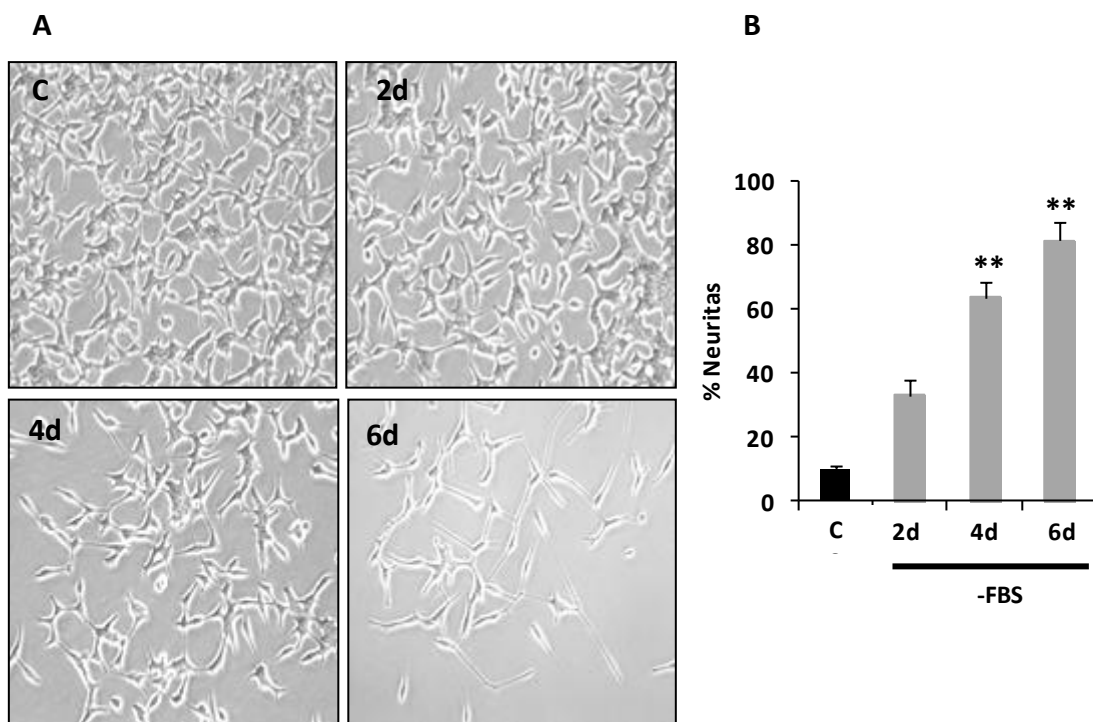


Figura 15. Aspecto morfológico de la diferenciación neuroendocrina inducida por eliminación de suero del medio de cultivo en células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** Aspecto morfológico observado mediante microscopia de contraste de fase (400x) durante 2, 4 y 6 días (2d, 4d, 6d) sin suero (-FBS). El control (C) son células LNCaP cultivadas durante 6 días en presencia de suero. **B.** Cuantificación de células con presencia de neuritas de longitud superior al doble del cuerpo celular. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cinco experimentos independientes (** $p < 0,01$ con respecto al control).

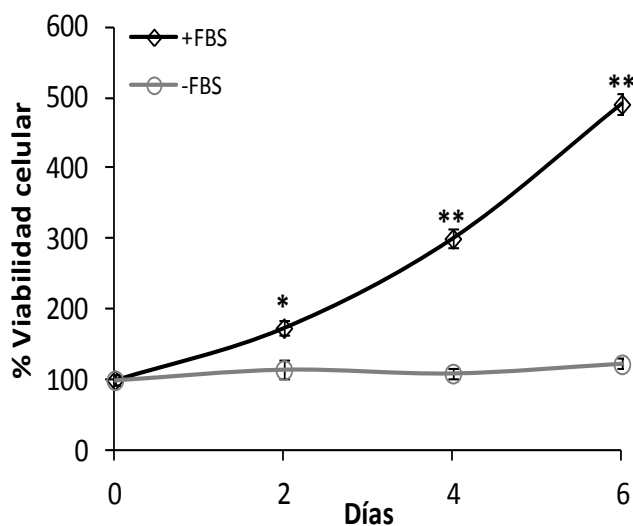


Figura 16. Efecto de la eliminación de suero del medio de cultivo sobre la viabilidad celular. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Medida de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT durante 2, 4 y 6 días en presencia y ausencia de suero (+FBS y -FBS respectivamente). El día 0 se consideró como el 100% de células vivas y los valores obtenidos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al día 0).

Como ya se ha comentado en la introducción, las células NE del cáncer de próstata sintetizan y secretan una gran variedad de productos de secreción, algunos de los cuales se utilizan como marcadores de diferenciación neuroendocrina. Entre ellos destacan la enolasa específica de neuronas (*Neuronal Specific Enolase*, NSE) y β III-tubulina (β III Tub) y ambos fueron utilizados como marcadores de NED en esta tesis doctoral.

La enolasa es una enzima dimérica de la vía glucolítica de la cual existen tres subunidades codificadas cada una por un gen diferente: α , β y γ . De la combinación de estas tres subunidades surgen cinco isoenzimas, siendo los homodímeros los que se expresan más frecuentemente en células humanas. El homodímero $\alpha\alpha$ -enolasa o ENO1 se encuentra presente en la mayoría de las células, el homodímero $\beta\beta$ -enolasa o ENO3 está presente únicamente en músculo, en tanto que el homodímero $\gamma\gamma$ -enolasa, ENO2 o NSE se expresa en neuronas y células neuroendocrinas (Schmechel et al. 1978; Kato et al. 1983). Para confirmar que la retirada de suero en nuestro modelo celular inducía la NED, se determinaron los niveles de la proteína NSE durante 2, 4 y 6 días. Los niveles de NSE aumentan a partir de los dos días de retirada de suero (Figura 17A). Posteriormente se midieron los niveles de ARN mensajero de NSE en células NE. Como se observa en la figura 17B, la eliminación de suero durante 6 días induce un aumento de los niveles de ARN mensajero de NSE en células NE.

En las mismas condiciones en las que se midieron los niveles de NSE, se analizó la expresión proteica de β III-tubulina (β III Tub). Existen varias isoformas de β -tubulina, cuya expresión varía desde la expresión constitutiva (β I-tubulina y β IVb-tubulina) hasta la expresión específica de tejido (β II-tubulina, β III-tubulina y β IV-tubulina). Se ha descrito que β III Tub tiene expresión específica de tejido neuronal y también ha sido hallada a altas concentraciones en tumores de CPRC (Burkhart et al. 2001; Terry et al. 2009) razón por la cual se utiliza su expresión como marcador de NED. Al igual que NSE, los niveles de β III Tub aumentan a partir de los dos días de retirada de suero (Figura 17A).

Las células NE del CP no expresan receptor de andrógenos (*Androgen Receptor*, AR) ni antígeno prostático específico (*Prostate Specific Antigen*, PSA) (Huang et al. 2006). En nuestro modelo celular de NED, las células NE tienen niveles menores de AR y de PSA con respecto a las células LNCaP (Figura 17C).

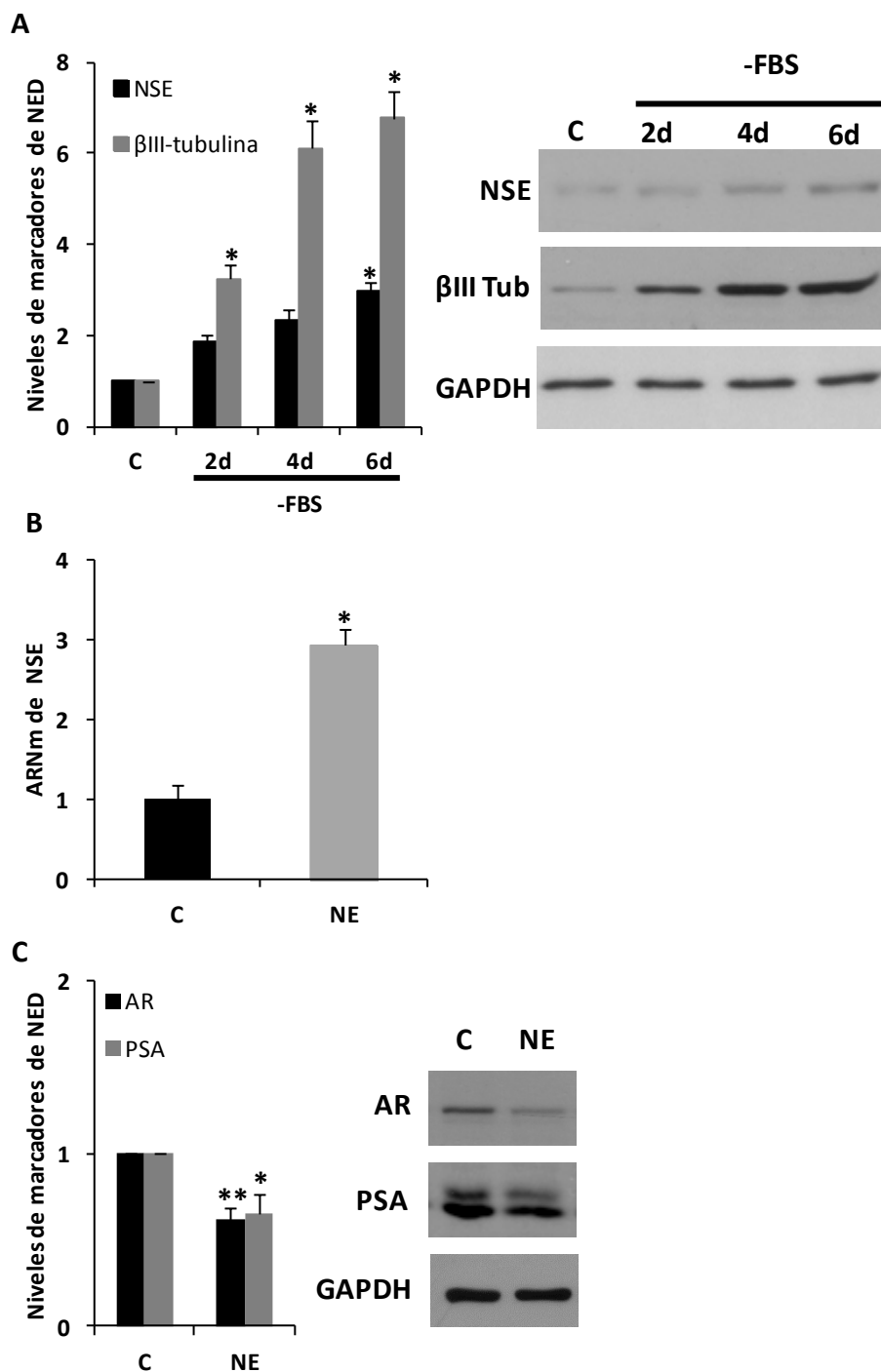


Figura 17. Niveles de marcadores neuroendocrinos en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* durante 2, 4 y 6 días (2d, 4d, 6d) sin suero (-FBS). El control (C) son células LNCaP cultivadas durante 6 días en presencia de suero. **B.** ARNm correspondiente a enolasa específica de neuronas (NSE) medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. **C.** Niveles de receptor de andrógenos (AR), antígeno prostático específico (PSA) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes (*p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control).

Para analizar la distribución celular de β III-tubulina en las células NE se utilizó un anticuerpo primario anti- β III-tubulina y un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Texas Red, observando las células mediante microscopía confocal. Como se aprecia en la figura 18, en las células LNCaP la proteína β III-tubulina tiene un patrón de fluorescencia uniforme y tan solo muestra intensidad en pocas células. En tanto que, en las células NE hay un aumento en la intensidad y un cambio en el patrón de la fluorescencia, indicando un aumento en la cantidad y distribución de la esta proteína que se localiza en las prolongaciones.

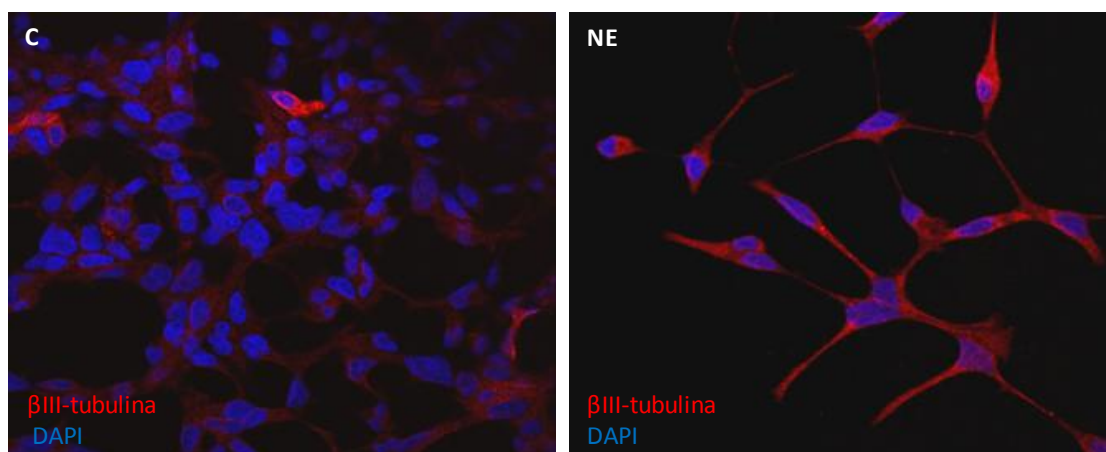


Figura 18. Localización celular de β III-tubulina en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Localización celular de β III-tubulina (rojo) en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) analizada mediante microscopía confocal de fluorescencia (40X). Los núcleos están marcados con DAPI (azul).

Se ha demostrado que la adquisición de NED en células LNCaP es un proceso reversible, pues cuando el estímulo que lo provoca es retirado del medio de cultivo el fenómeno revierte (Shen et al. 1997; Cox et al. 1999). Para demostrar esta característica, se cultivaron células LNCaP durante 12 días en presencia de FBS (C), células LNCaP durante 12 días en ausencia de FBS (NE) y células LNCaP durante 6 días en ausencia de FBS y posteriormente se repuso FBS durante 6 días más (NE+FBS). En estas condiciones se analizó el aspecto morfológico, el crecimiento celular y los niveles de los marcadores neuroendocrinos NSE, β III Tub y AR. La reposición de FBS al medio de cultivo disminuyó la cantidad de células con neuritas (Figura 19A), generó un aumento en el crecimiento celular (Figura 19B) y, por último, fue capaz de disminuir los niveles de marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub y aumentar los niveles de AR (Figura 19C).

Por lo tanto, el modelo de inducción de NED en las células tumorales de próstata LNCaP mediante retirada de suero del medio de cultivo cumple con las características morfológicas y moleculares que se observan en las células NE del CP y es un buen modelo para estudiar los mecanismos moleculares que se producen en este proceso.

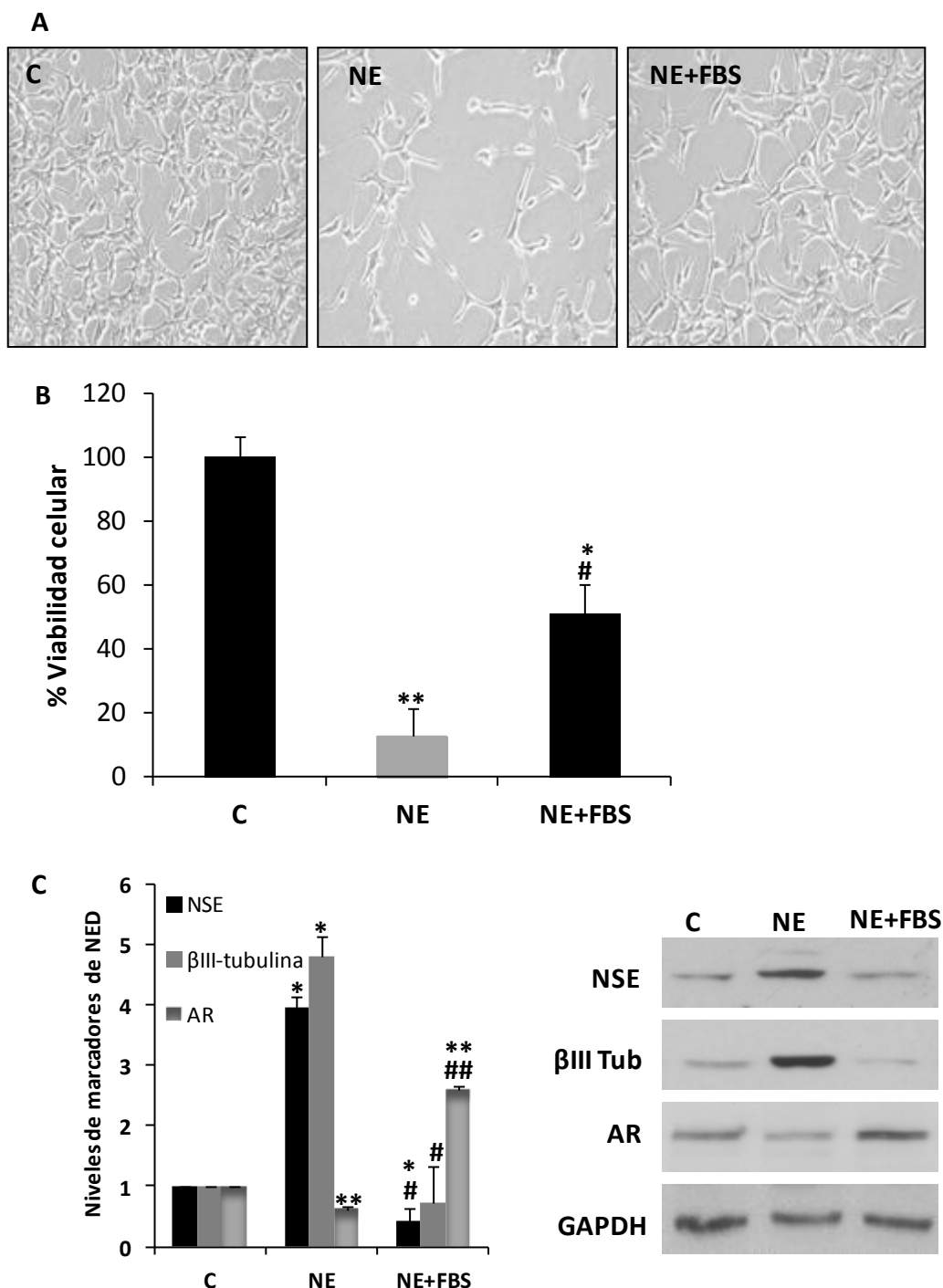


Figura 19. La diferenciación neuroendocrina es un proceso reversible en células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** Aspecto morfológico observado mediante microscopia de contraste de fase (400x) de células LNCaP (control, C), células neuroendocrinas (NE) y células NE a las que se les añadió medio con suero durante 6 días (NE+FBS). **B.** Medida de la viabilidad celular mediante ensayo de MTT en las mismas condiciones que A. El valor obtenido de las células LNCaP control se consideró como el 100% de células vivas y los valores obtenidos fueron referidos a este dato. **C.** Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub), receptor de andrógenos (AR) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en las mismas condiciones que A. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes (*p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control; # p<0,05 y ## p<0,01 con respecto a NE).

2. Estudio de los niveles de interleuquina-6 en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

La interleuquina 6 (IL-6) es una citoquina responsable de múltiples respuestas celulares fisiológicas en diversos tipos celulares que incluyen la respuesta inmune, la inflamación y la hematopoyesis, entre otros. La IL-6 también se relaciona con procesos patológicos como la regulación del crecimiento, activación génica, proliferación, supervivencia y diferenciación de células tumorales. En células de CP, IL-6 ha sido caracterizada como un factor que actúa de manera autocrina o paracrina capaz de promover la NED (Okamoto et al. 1997a; Okamoto et al. 1997b; Lee et al. 2007). Resultados de estudios clínicos revelan que el nivel de IL-6 y su receptor se encuentran elevados en pacientes con CP, principalmente en los que presentan resistencia a la terapia de eliminación de andrógenos asociada con la NED (Siegsmund et al. 1994; Adler et al. 1999; Drachenberg et al. 1999; Shariat et al. 2001; Giri et al. 2001; Michalaki et al. 2004). El tratamiento de células LNCaP con IL-6 induce NED caracterizada por la aparición de morfología típicamente neuronal, reducción de ritmo de crecimiento y elevación del nivel de marcadores neuroendocrinos (Qiu et al. 1998; Deeble et al. 2001; Zelivianski et al. 2001; Zhu et al. 2014; Weaver et al. 2015, Morell et al. 2016).

Por lo expuesto anteriormente, consideramos interesante analizar los niveles de IL-6 en nuestro modelo celular de NED. Para ello se determinaron los niveles de ARNm y proteína de IL-6 en células LNCaP y células NE. La figura 20 muestra que las células NE tienen niveles mayores de expresión de ARNm y proteína de IL-6 que las células LNCaP.

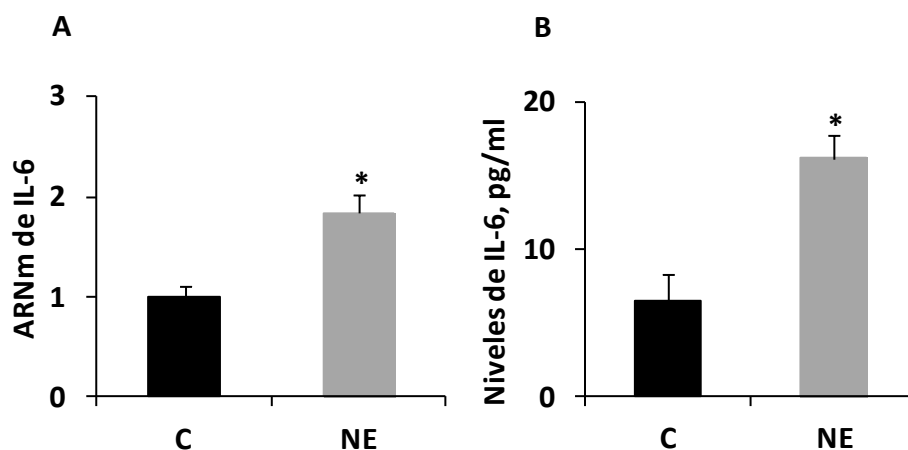


Figura 20. Aumento de los niveles de interleuquina 6 en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** ARNm correspondiente a interleuquina 6 (IL-6) medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con ARNm de GAPDH. **B.** Niveles de interleuquina 6 (IL-6) medidos mediante ensayo ELISA en sobrenadantes obtenidos de células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).

3. Estudio del efecto de las células neuroendocrinas sobre el crecimiento y capacidad tumoral de células resistentes a andrógenos.

3.1. Efecto mitogénico de células neuroendocrinas sobre el crecimiento de células de cáncer de próstata PC-3.

Las células neuroendocrinas del cáncer del próstata secretan una variedad de neuropéptidos y factores de crecimiento que tienen efectos mitogénicos sobre las células cancerígenas adyacentes contribuyendo al crecimiento de manera independiente de andrógenos (Bonkhoff et al. 1995; Yuan et al. 2007; Nelson et al. 2007; Alberti 2010). A pesar de ser células no proliferativas se suelen encontrar en áreas tumorales con el índice de proliferación más alto (Grobholz et al. 2005).

Con el fin de analizar el efecto que pueda ejercer la presencia de células NE en el crecimiento de células tumorales, se cultivaron a la vez (co-cultivo) células andrógeno-independientes PC-3 con células LNCaP o con células NE. Los co-cultivos de células PC-3 con células LNCaP crecieron a un ritmo inferior al de los co-cultivos de células PC-3 con células NE (Figura 21). Esto indicaba que las células NE producían algo que estimulaba el crecimiento de las células PC-3. Con el objetivo de establecer si las células NE estaban secretando algún factor que ejerciera un efecto mitogénico sobre las células PC-3, se añadió el sobrenadante de cultivos de células NE a cultivos de células PC-3. Dichos sobrenadantes fueron capaces de aumentar la proliferación de las células PC-3, casi al mismo nivel que cuando estaban cultivadas en presencia de suero (Figura 22). Este resultado indicaba que las células NE estaban liberando algo al medio que aumentaba el crecimiento de las células PC-3.

3.2. El efecto mitogénico de los sobrenadantes de células neuroendocrinas no está mediado por IL-6.

Con el fin de comprobar si la IL-6 producida por las células NE era la responsable del aumento de crecimiento de las células PC-3, se silenció su expresión en células NE y se añadieron los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de estas células silenciadas a cultivos de células PC-3. Como se observa en la figura 23 los sobrenadantes de células NE en los que se silenció IL-6 indujeron un aumento de crecimiento similar al inducido por el sobrenadante de las células NE con IL-6 no silenciada.

Para confirmar que el efecto mitogénico de los sobrenadantes de células NE no estaba mediado por IL-6, a los cultivos de células PC-3 que se mantuvieron en presencia de sobrenadantes de células NE silenciadas para IL-6 se les añadió IL-6 humana recombinante. La adición de IL-6 humana recombinante a los sobrenadantes de células NE silenciadas para IL-6 no produjo modificación en el crecimiento de los

cultivos de células PC-3 hecho que confirmaba que el efecto mitogénico de los sobrenadantes de células NE no estaba mediado por IL-6 (Figura 24).

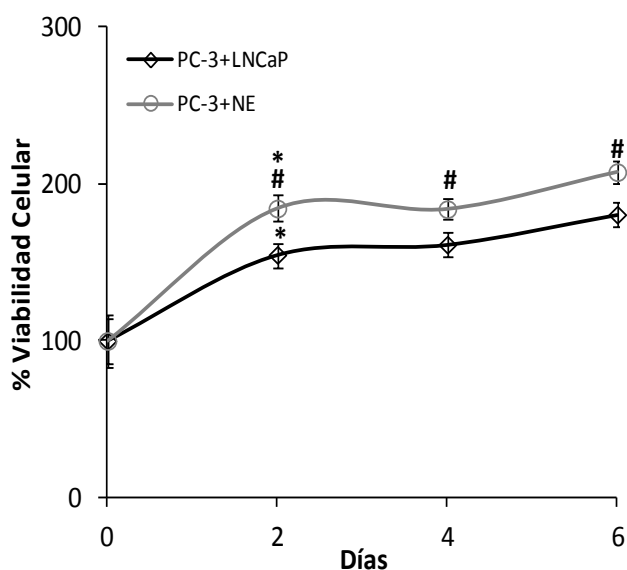


Figura 21. Efecto del co-cultivo de células PC-3 con células LNCaP o con células neuroendocrinas sobre la viabilidad celular. Las células PC-3 se sembraron junto con células LNCaP o con células NE en ausencia de suero durante 2, 4 y 6 días. La viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. El día 0 se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos fueron referidos a este dato. Los datos mostrados representan la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ con respecto al día 0; # $p < 0,05$ con respecto al co-cultivo PC-3+LNCaP en esa misma condición).

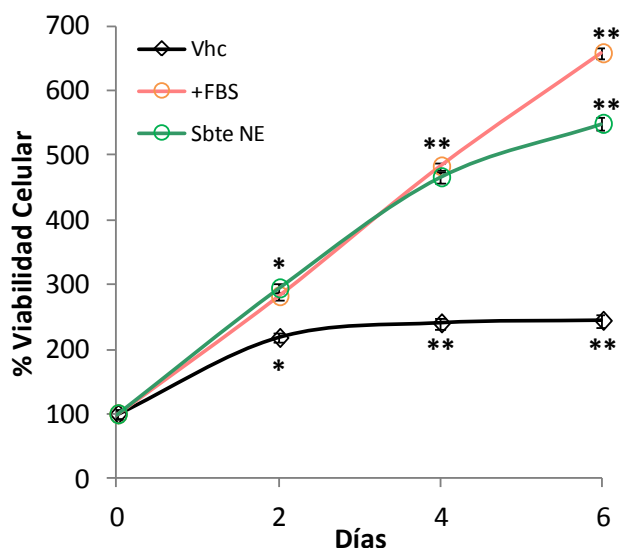


Figura 22. Efecto de los sobrenadantes de cultivos de células neuroendocrinas sobre la viabilidad de células PC-3. Las células PC-3 se sembraron y cultivaron en las siguientes condiciones: en ausencia de suero (vehículo, Vhc), en presencia de suero (+FBS) o en presencia de sobrenadantes de células neuroendocrinas (Sbte NE) durante 2, 4 y 6 días. La viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. El día 0 se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de seis experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al día 0).

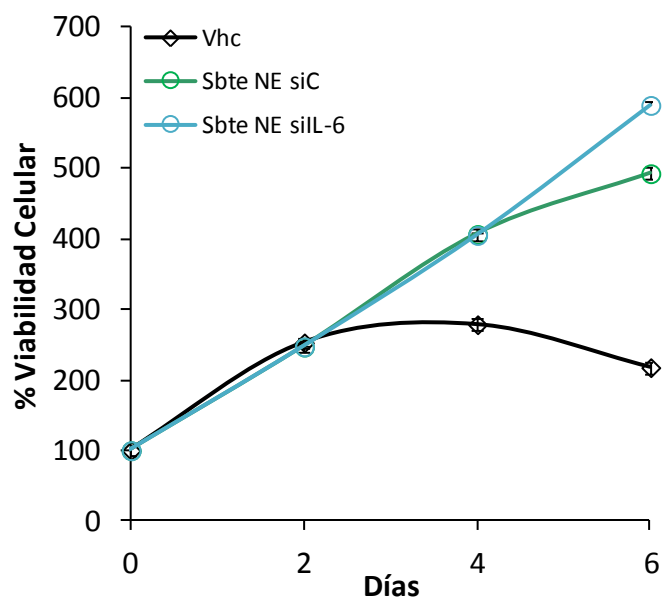


Figura 23. Efecto de los sobrenadantes de cultivos de células neuroendocrinas silenciadas para IL-6 sobre la viabilidad de células PC-3. Las células PC-3 se sembraron y cultivaron en las siguientes condiciones: en ausencia de suero (Vhc), en presencia de sobrenadantes de células neuroendocrinas (Sbate NE siC) o en presencia de sobrenadantes obtenidos de células neuroendocrinas transfectadas con ARN de interferencia selectivo para IL-6 (Sbate NE siIL-6) durante 2, 4 y 6 días. La viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. El día 0 se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

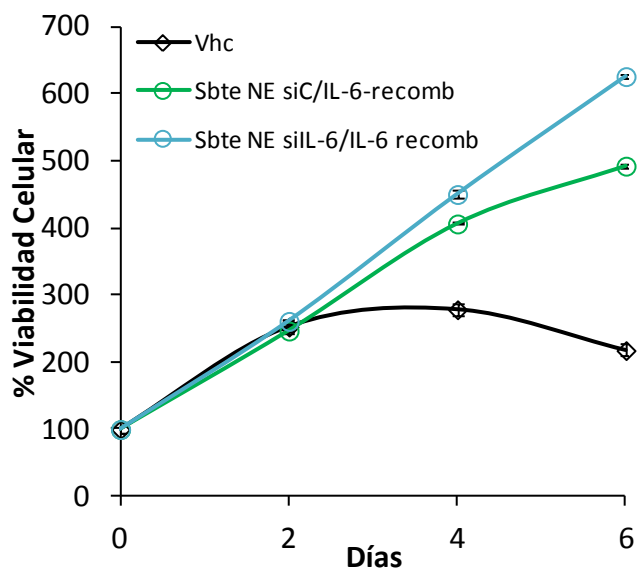


Figura 24. Efecto de la adición de IL-6 humana recombinante a los sobrenadantes de cultivos de células neuroendocrinas silenciadas para IL-6 sobre la viabilidad de células PC-3. Las células PC-3 se sembraron y cultivaron en las siguientes condiciones: en ausencia de suero (Vhc), en presencia de sobrenadantes obtenidos de células neuroendocrinas y adicionados con IL-6 humana recombinante a una dosis de 100ng/ml (Sbate NE siC/IL-6 recomb) o en presencia de sobrenadantes obtenidos de células neuroendocrinas transfectadas con RNA de interferencia selectivo para IL-6 y adicionados con IL-6 humana recombinante a una dosis de 100ng/ml (Sbate NE siIL-6/IL-6recomb). durante 2, 4 y 6 días. La viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. El día 0 se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de dos experimentos independientes realizados por triplicado.

3.3. Efecto de células neuroendocrinas sobre el crecimiento tumoral de células PC-3.

Para confirmar el efecto estimulante del crecimiento que ejercían las células NE sobre las células PC-3, se realizó un estudio *in vivo* induciendo tumores xenógrafos en ratones inmunodeprimidos. Los tumores se generaron inyectando subcutáneamente una mezcla en partes iguales de células PC-3+LNCaP o PC-3+NE. El tamaño de los tumores se midió durante 30 días y, como se observa en la figura 25, el ritmo de crecimiento de los tumores generados por la combinación de células PC-3+NE fue superior al de los generados por la combinación de células PC-3+LNCaP. Este resultado pone en evidencia que la presencia de células NE estimula el crecimiento tumoral *in vivo* de células PC-3.

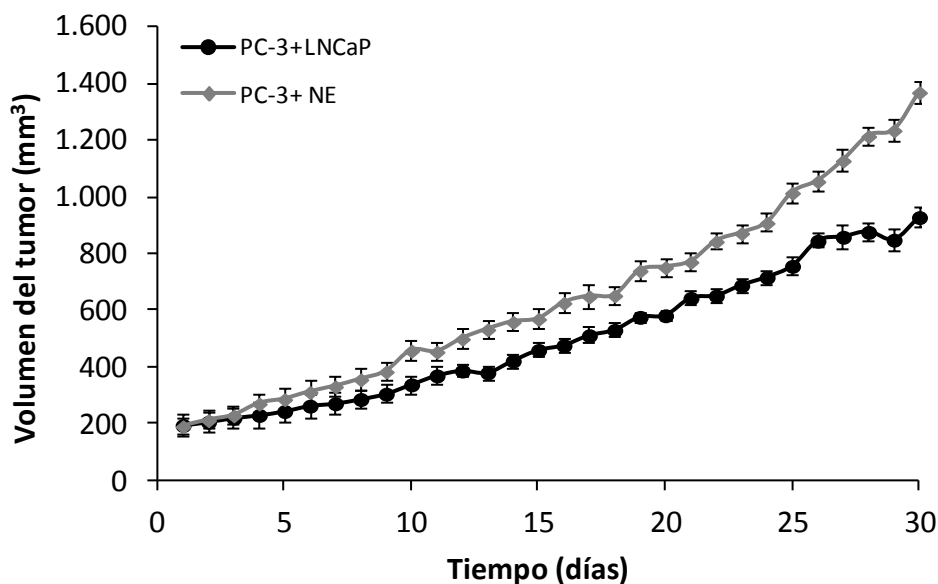


Figura 25. Efecto de la presencia de células NE sobre el crecimiento tumoral de células PC-3. Se inyectaron subcutáneamente ratones inmunodeprimidos con una mezcla de células PC-3+LNCaP o con una mezcla de células PC-3+NE tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. El volumen del tumor se calcula con la fórmula $0,523 \times W \times L$; siendo W el ancho del tumor y L la longitud del mismo. Los datos mostrados representan la media \pm C.V. de 5 ratones por grupo.

4. Estudio de la señalización celular en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP.

4.1. Vía de señalización PI3K/Akt/mTOR.

La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR ha sido descrita como un componente esencial para la supervivencia de las células de cáncer de próstata, debido fundamentalmente al hecho de que en el mismo se produce una mutación en la fosfatasa PTEN que regula la actividad de Akt, como se ha descrito en la introducción. Además, se sabe que esta vía está frecuentemente alterada en los tumores neuroendocrinos y que juega un papel fundamental en el desarrollo de la NED en células LNCaP en presencia de diferentes estímulos (Gutierrez-Cañas et al. 2005; Wu & Huang 2007, Martín-Orozco et al. 2007, Cortés et al. 2012).

Para comprobar si en nuestro modelo celular de NED se producía una activación de la vía PI3K/Akt/mTOR se analizaron los niveles de expresión de Akt activo (fosforilado) y algunas de sus dianas como mTOR y S6 (Figura 26). Las células NE mostraron un aumento en la fosforilación de Akt con respecto a las células LNCaP, y un ligero aumento en la fosforilación de las dianas S6 y mTOR. Esto se correlacionaba con un aumento en los marcadores de NED, NSE y β III Tub, valorados como control del proceso.

Para comprobar la relevancia de la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR evaluamos el efecto de la inhibición de esta vía sobre la NED de las células LNCaP. Para ello, se utilizó LY294002 (inhibidor de PI3K I), inhibidor de Akt IV y rapamicina (inhibidor de mTORC1). Tanto el tratamiento con LY294002 como con el inhibidor de Akt IV produjeron disminución de la fosforilación de Akt en células LNCaP y en células NE, e impidieron el aumento de la expresión de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub en las células NE (Figura 27A y B), indicando que la activación de Akt estaba implicada en el proceso de neurodiferenciación. Además los inhibidores produjeron profundos cambios en la morfología de las células NE y es de remarcar que el inhibidor de Akt también produjo una profunda alteración morfológica de las células LNCaP (Figura 28). Por su parte, el tratamiento con rapamicina produjo una disminución de la fosforilación de la diana de mTORC1, P70S6K, solamente en células NE (Figura 27C). Dicho tratamiento impidió el aumento de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub y produjo cambios en el aspecto morfológico de las células NE (Figura 28).

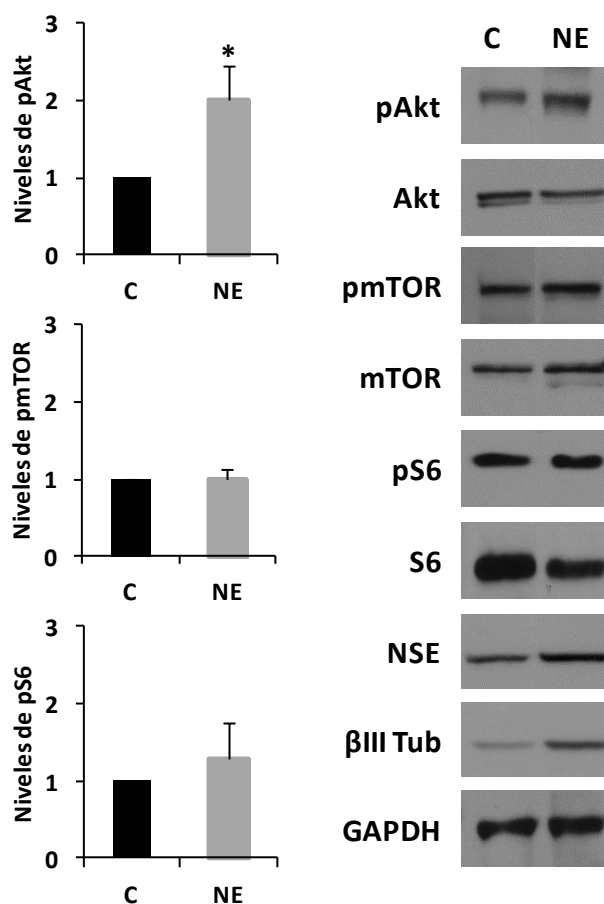
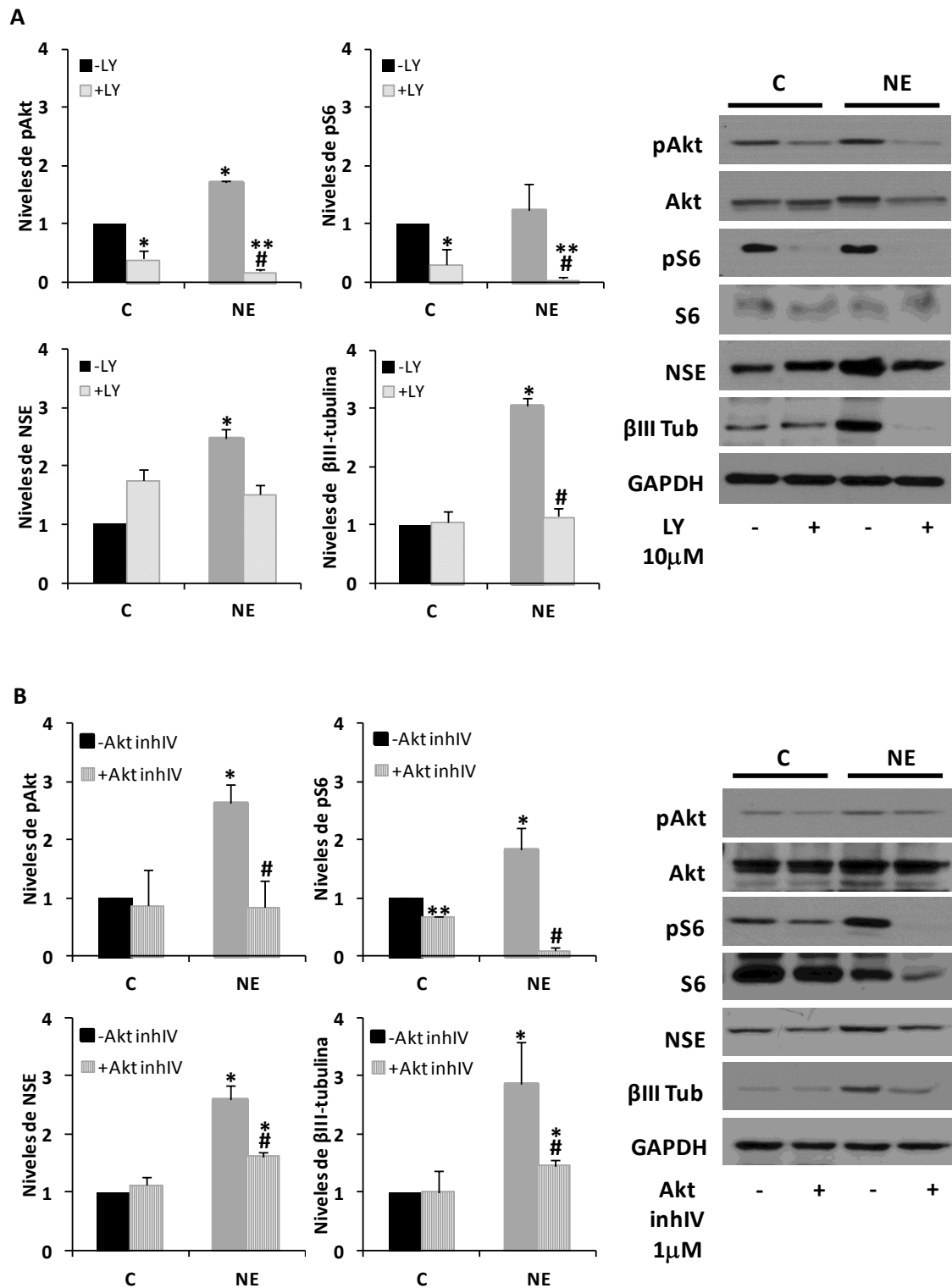


Figura 26. La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR está activada en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de pAkt, Akt, pmTOR, mTOR, pS6, S6, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).



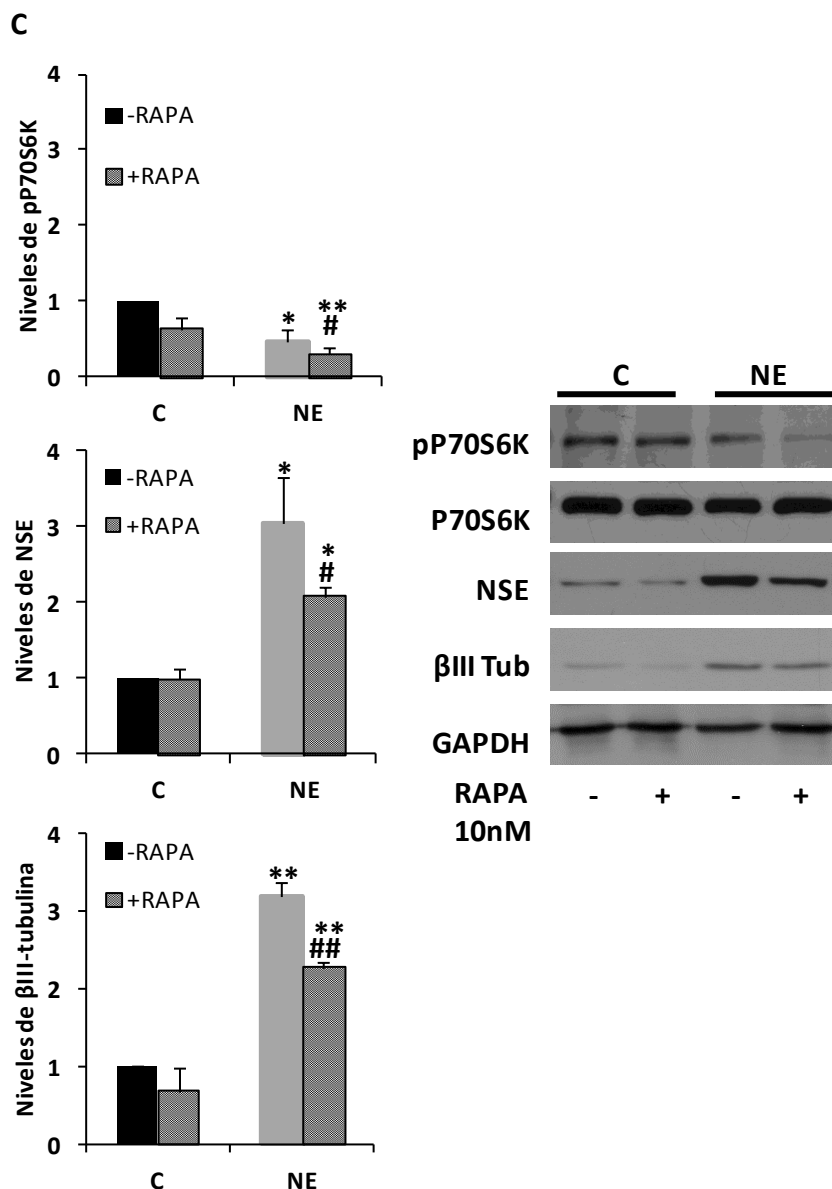


Figura 27. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A y B.** Niveles de pAkt, Akt, pS6, S6, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con LY294002 10μM (LY) (A) o con el inhibidor de Akt IV 1μM (Akt inh IV) (B). **C.** Niveles de pP70S6K, P70S6K, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con rapamicina 10nM (RAPA). Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de cuatro experimentos independientes (*p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control; # p<0,05 y ##p<0,01 con respecto a NE).

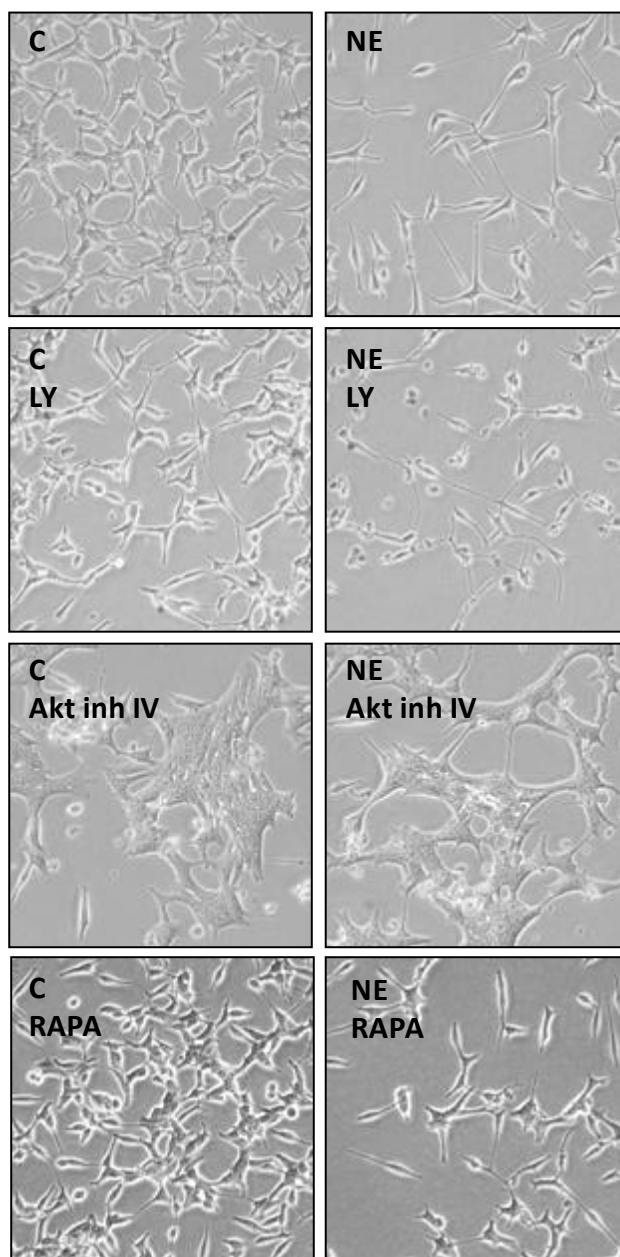


Figura 28. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre el aspecto morfológico de la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Aspecto morfológico de células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) obtenido mediante fotomicrografías de microscopía de contraste de fase (400x). En los casos indicados las células fueron tratadas durante 6 días con LY294002 10 μ M (LY), con el inhibidor de Akt IV 1 μ M (Akt inh IV) o con rapamicina 10nM (RAPA).

4.2. Quinasa dependiente de AMP.

La proteína quinasa dependiente de AMP, AMPK, es un sensor de los niveles energéticos de la célula. Aunque ha sido más estudiada por sus efectos sobre el metabolismo, AMPK participa en otras funciones como el crecimiento y la proliferación celular, entre otras (Hardie et al. 2016). Algunos tipos de células tumorales tienen mecanismos para disminuir la activación de AMPK, lo que les permite escapar de las vías de señalización que restringen el crecimiento.

Para conocer si se producían variaciones en la actividad de AMPK en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP, se analizó el nivel de la forma fosforilada de AMPK en la treonina de la posición 172 de la subunidad α , y de uno de sus principales sustratos, Acetil-CoA Carboxilasa, ACC. Como se observa en la figura 29, en la NED se produce una disminución en la actividad de AMPK, ya que disminuyen los niveles de AMPK fosforilada y los niveles de fosforilación de ACC. Curiosamente también se observa una disminución de ACC total, indicando que además se inhibe su expresión. Estos cambios se correlacionan con un aumento en la expresión de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, valorados como control del proceso.

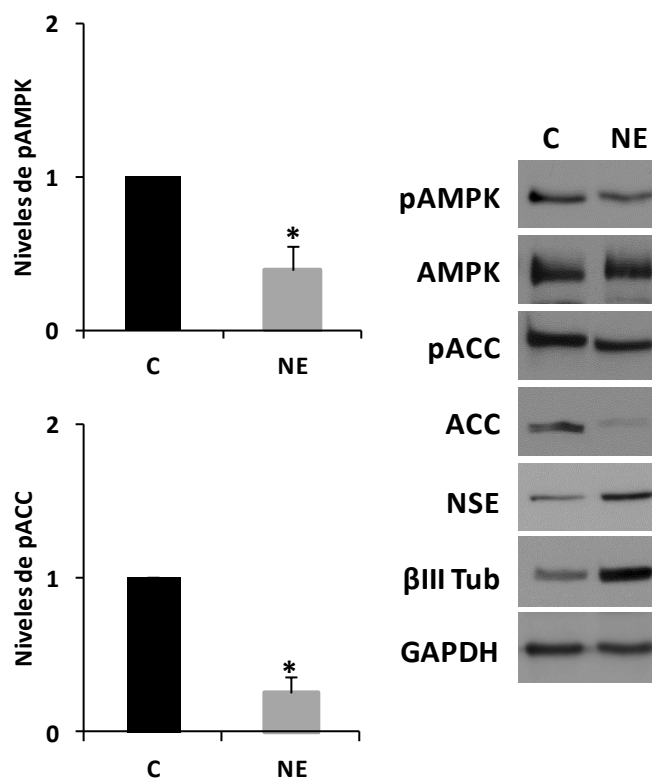


Figura 29. La quinasa dependiente de AMP (AMPK) está inhibida en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de pAMPK, AMPK, pACC, ACC, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).

Para evaluar el efecto de la modulación de la actividad de AMPK en la diferenciación neuroendocrina se utilizó AICAR, un activador alostérico de AMPK. En primer lugar, se analizó el efecto activador de AICAR sobre AMPK realizando un ensayo a diferentes tiempos y midiendo los niveles de AMPK y ACC fosforilado, tal y como indica la figura 30.

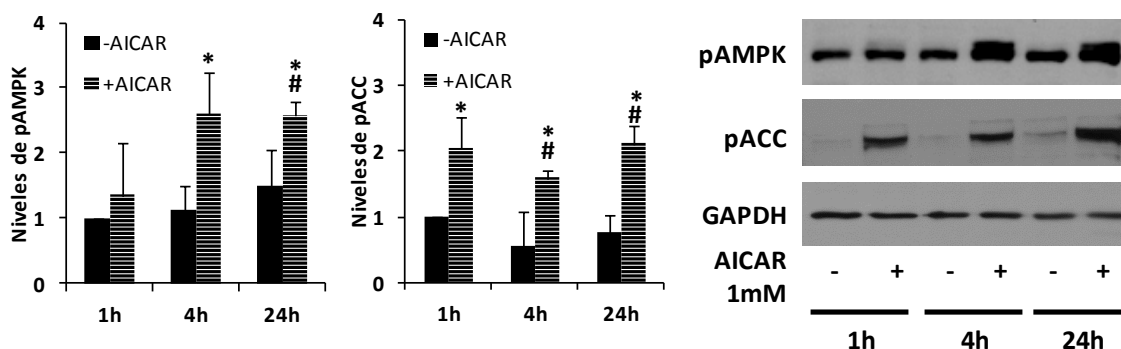


Figura 30. Activación de AMPK mediante el tratamiento con AICAR en células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en ausencia de suero durante 1, 4 y 24 horas. Niveles de pAMPK, pACC y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* durante 1, 4 y 24 horas. En los casos indicados las células fueron tratadas durante 1, 4 y 24 horas con AICAR 1mM. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control de 1 hora; # $p < 0,05$ con respecto a cada control del tiempo respectivo).

Posteriormente, se analizó la activación de AMPK y los cambios en la expresión de los marcadores de neuroendocrinos, en las condiciones establecidas de tiempo para nuestro modelo celular de NED. En dichas condiciones, el tratamiento con AICAR durante 6 días, aunque no produjo cambios evidentes en la fosforilación de AMPK, indujo un aumento en la fosforilación de ACC, indicando que efectivamente se estaba activando AMPK (Figura 31). Con esta activación se produjo una notable disminución de los marcadores neuroendocrinos, especialmente β III Tub, indicando que no solo AMPK estaba inhibida durante la NED, sino que además, su activación era capaz de impedir, al menos en parte, el proceso de NED. El tratamiento con AICAR, además produjo modificaciones en las características morfológicas de las células NE (Figura 32). Estos resultados indican que la activación de AMPK con AICAR es capaz de impedir el aumento de marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, como así también la adquisición del fenotipo neuroendocrino.

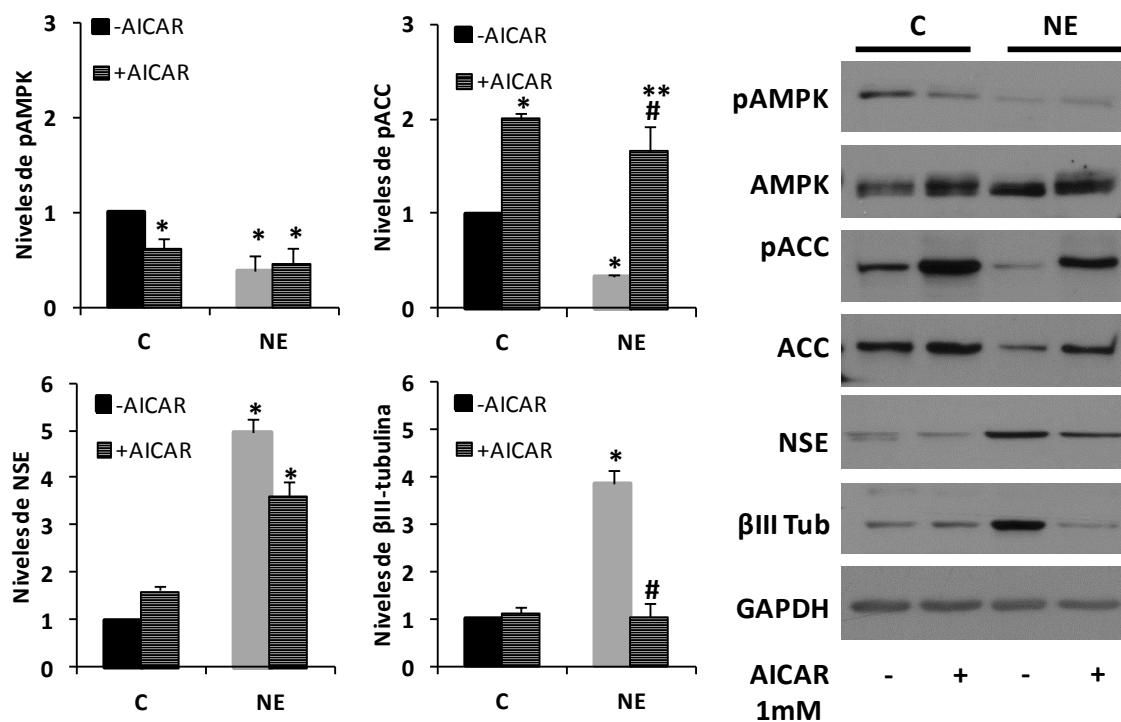


Figura 31. Efecto de la activación de AMPK en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de pAMPK, AMPK, pACC, ACC, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con AICAR 1mM. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

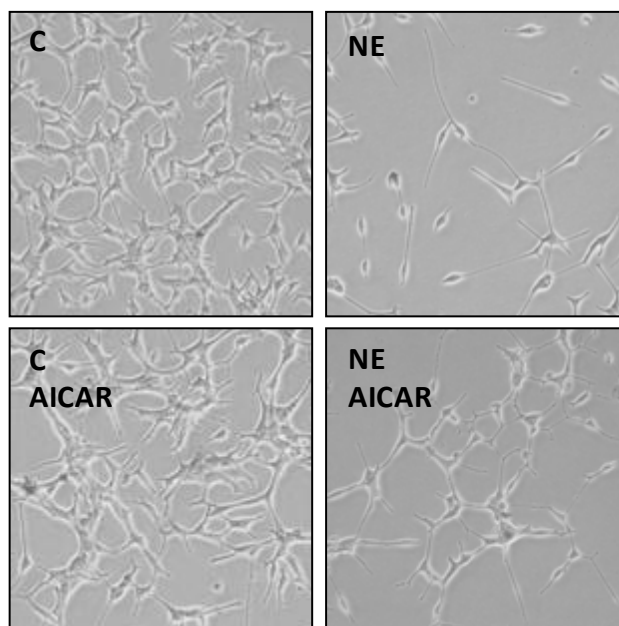


Figura 32. Efecto de la activación de AMPK sobre el aspecto morfológico de la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Aspecto morfológico de células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) obtenido mediante fotomicrografías de microscopía de contraste de fase (400x). En los casos indicados las células fueron tratadas durante 6 días con AICAR 1mM.

4.3. La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR produce activación de AMPK.

Con los datos obtenidos que confirmaban la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y su papel fundamental para el desarrollo de la NED, quisimos estudiar si existía correlación entre la actividad de esta vía y el estado de AMPK. Para ello se analizaron los niveles de fosforilación de AMPK y ACC en células tratadas con LY294002 o con el inhibidor de Akt IV. Tanto las células LNCaP como las células NE tratadas con LY294002 mostraron un aumento en la fosforilación de AMPK y ACC (Figura 33A). Por su parte, el tratamiento con el inhibidor de Akt IV, también indujo un aumento en la fosforilación de AMPK y de ACC (Figura 33B). Es interesante resaltar que los marcadores de NED, NSE y β III Tub disminuyeron en las células NE tratadas tanto con LY294002 como con el inhibidor de Akt IV. Estos resultados ponen de manifiesto que la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR produce activación de AMPK que induce disminución de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub en células NE.

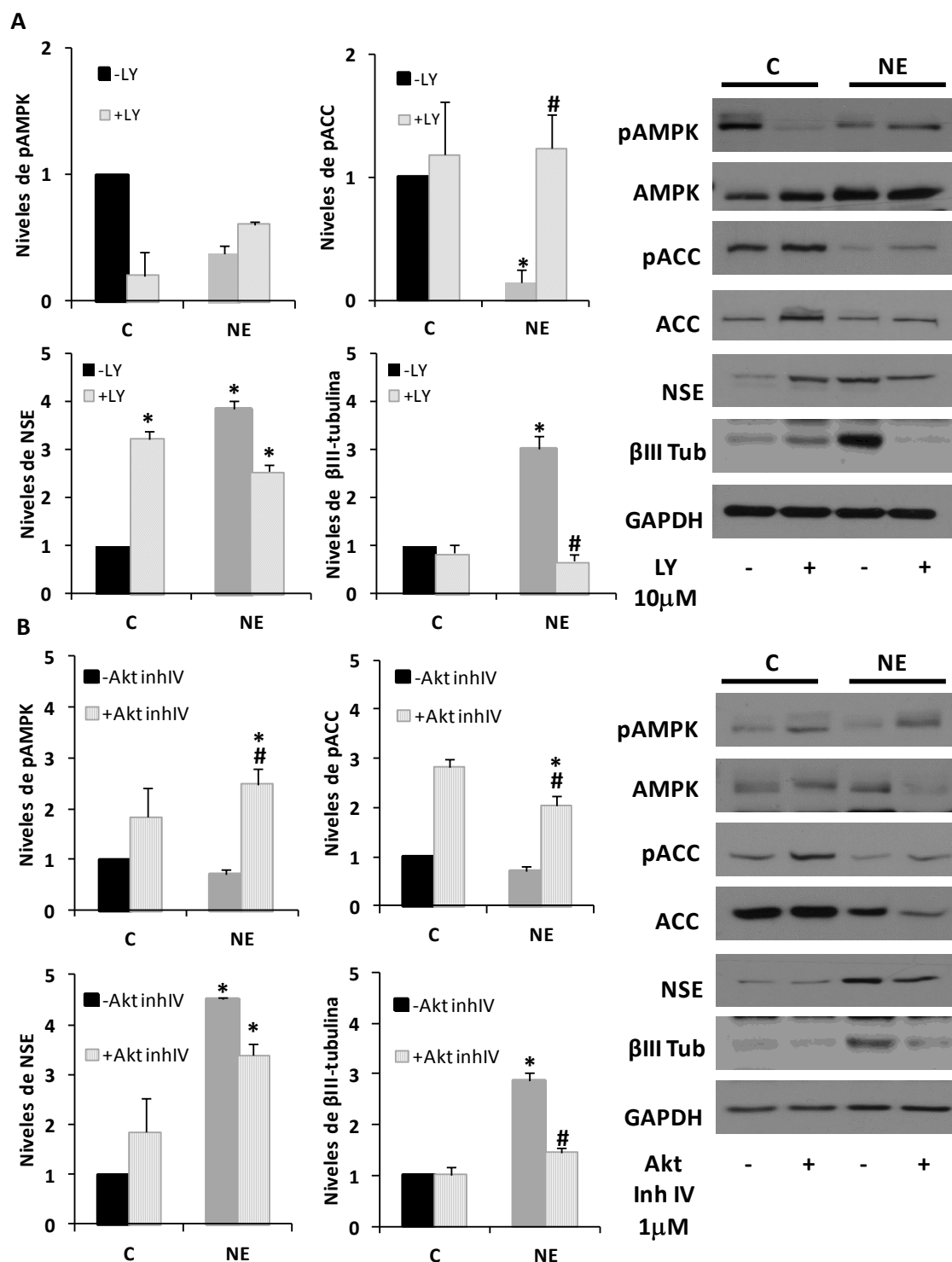


Figura 33. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre AMPK en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A, B.** Niveles de pAMPK, AMPK, pACC, ACC, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con LY294002 10μM (LY) (A) o con el inhibidor de Akt 1μM (Akt inh IV) (B). Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de cinco experimentos independientes (*p<0,05 con respecto al control; # p<0,05 con respecto a NE).

5. Estudio de la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

5.1. Activación de la autofagia durante la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

Las células tumorales pueden utilizar la autofagia para prolongar su supervivencia en condiciones adversas. Así, en muchos tipos de cánceres, incluido el cáncer de próstata, la activación de la autofagia se ha postulado como un mecanismo de adaptación al tratamiento antitumoral (Kung 2011). Por tal motivo, se quiso comprobar si en nuestro modelo de diferenciación neuroendocrina la autofagia se activaba.

Como se ha comentado en la introducción, durante la activación de la autofagia la forma citosólica de LC3 (LC3I), se conjuga con fosfatidiletanolamina y se incorpora en la membrana de los autofagosomas (LC3 II). Este cambio de la localización de LC3 se utiliza como marcador de autofagia (Klionsky et al. 2016). Para establecer cuál era el estado de la autofagia en nuestro modelo de NED, en primer lugar se analizaron los niveles de LC3 durante una cinética de retirada de suero. Como se observa en la figura 34A, conforme avanzaba el proceso de NED, las células mostraron un aumento de LC3 II. Para determinar si el aumento de LC3 II se debía a un aumento del número de autofagosomas o a un bloqueo de su degradación se realizaron ensayos de flujo autofágico, utilizando bafilomicina A1 (BafA1) (Klionsky et al. 2016). La bafilomicina A1 es capaz de impedir la fusión del autofagosoma con el lisosoma, evitando así que el contenido del autofagosoma entre en el contacto con el contenido del lisosoma y por lo tanto evitando la degradación de los autofagosomas. Este efecto se consigue utilizándola a dosis altas por cortos períodos de tiempo. Por otro lado, la bafilomicina A1 es capaz de inhibir la bomba de H^+ de la membrana lisosomal impidiendo la acidificación del lisosoma, para lo cual se necesitan dosis menores de BafA1 actuando durante un tiempo prolongado. Además para inhibir la autofagia se utilizaron inhibidores de proteasas lisosomales, E64d y pepstatina A (E64d+PA). Ambos tipos de tratamientos se realizaron durante tres horas antes de finalizar la retirada de suero a dosis elevadas. Al tratar las células con BafA1, se produjo un acúmulo de LC3 II, siendo el efecto evidente a partir de los dos días de retirada de suero. En iguales condiciones de eliminación de suero que las citadas para la figura 34A, las células recibieron tratamiento con E64d+PA, aunque en este caso el acúmulo de LC3 II no fue tan efectivo como con BafA1 (Figura 34B). En ambos casos, se utilizó como control del proceso de NED el marcador neuroendocrino NSE.

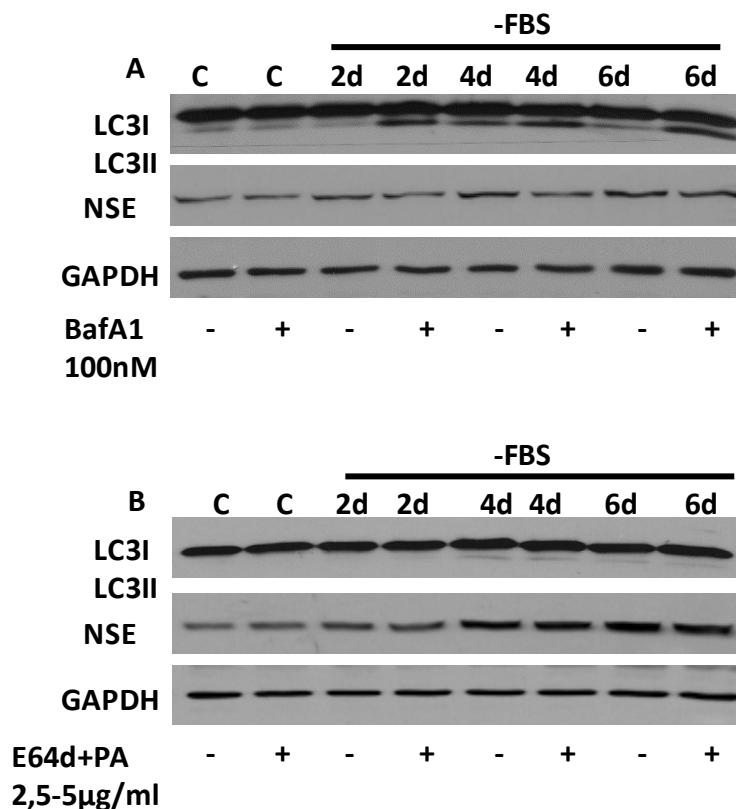


Figura 34. Estado de la autofagia durante la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A, B.** Niveles de LC3, enolasa específica de neuronas (NSE), y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* durante 2, 4 y 6 días sin suero (-FBS). El control (C) son células LNCaP cultivadas durante 6 días en presencia de suero. En los casos indicados, las células fueron tratadas con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) (A) o con E64d+PepstatinaA 2,5-5µg/ml (E64d+PA) (B) durante las últimas 3 horas.

Con los resultados obtenidos, se decidió analizar la localización celular de LC3 realizando un ensayo de microscopía confocal utilizando un anticuerpo primario anti-LC3 y un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488. Cuando la autofagia se encuentra en condiciones basales, se observa un patrón de distribución homogéneo pero cuando hay una activación de la misma, LC3 II se incorpora en los autofagosomas y se observa un patrón de fluorescencia punteado. En la figura 35 se aprecia que las células LNCaP mostraron un patrón homogéneo, en tanto que las células NE presentaron una señal fluorescente levemente más intensa con respecto a las células LNCaP. Posteriormente, se midió la distribución de LC3 en ambos tipos celulares realizando un tratamiento de 3 horas con bafilomicina A1 100 nM, y se observó que en células LNCaP no se produjo un aumento significativo de la señal y no hay un patrón de punteado. En cambio, en estas mismas condiciones, las células NE incrementaron significativamente su señal fluorescente con respecto a células LNCaP apareciendo el punteado característico de LC3 II asociado a los autofagosomas. Este resultado confirma el aumento de LC3 medido por *Western blot* demostrando que en las células NE hay más autofagosomas y por tanto la autofagia está activada con respecto a las células LNCaP.

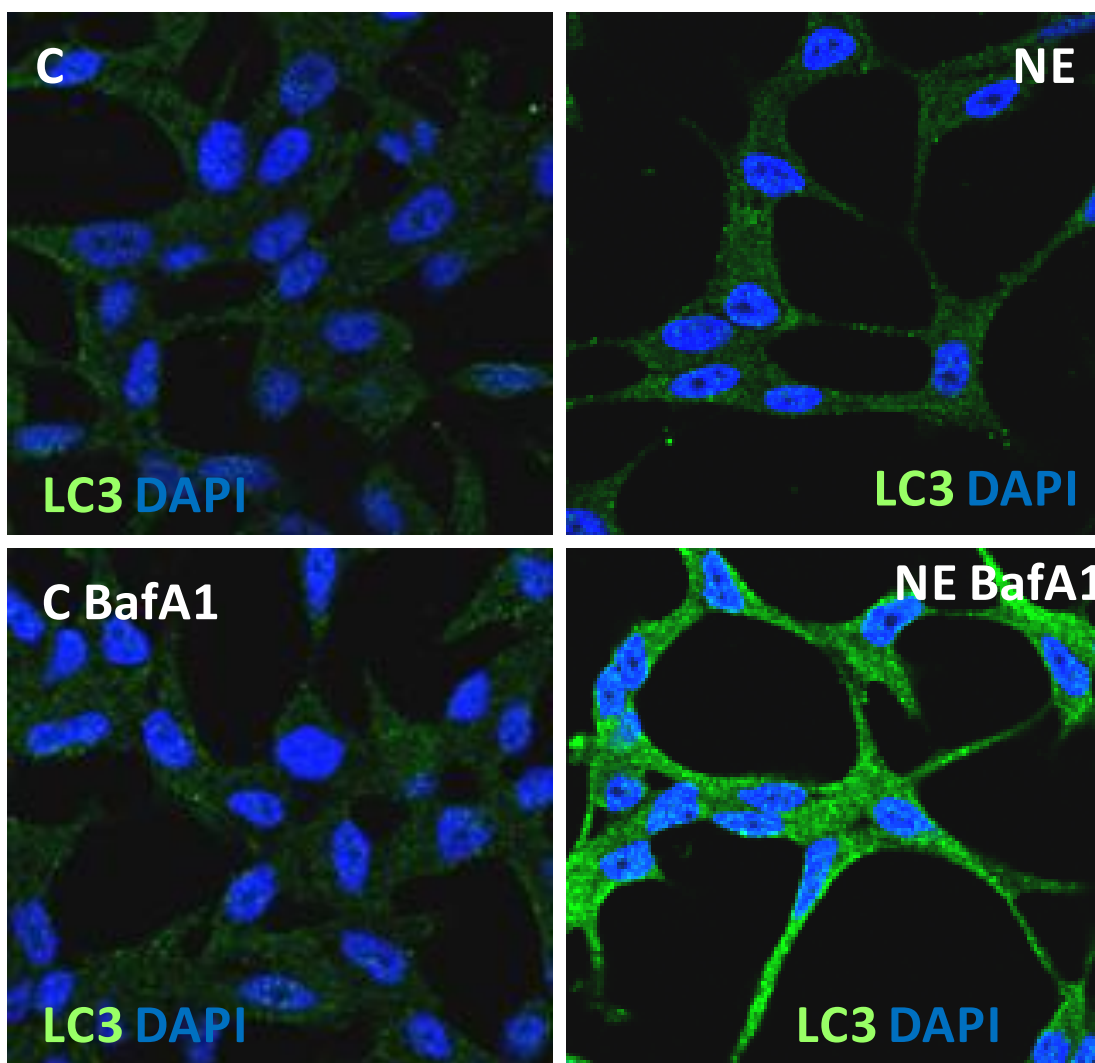


Figura 35. Localización celular de LC3 en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Localización de LC3 (verde) en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) analizada mediante microscopía confocal de fluorescencia (63X). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). En los casos indicados, las células fueron tratadas con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas.

Con este resultado, se decidió analizar si el acúmulo de LC3 II observado con el tratamiento con bafilomicina A1 estaba relacionado con una activación o con un bloqueo del flujo autofágico. Para ello, se midieron los niveles de p62. Esta proteína se une a diferentes moléculas que pueden ser degradadas mediante autofagia, siendo ella misma degradada durante el proceso (Kirkin et al. 2009). Por tal motivo, los niveles de p62 se utilizan como indicador de activación de autofagia, ya que una disminución de sus niveles indica una mayor actividad autofágica. Como se observa en la figura 36, en células NE hay una disminución de p62 con respecto a las células LNCaP. Cuando las células recibieron tratamiento con bafilomicina A1, los niveles de p62 no se modificaron, aunque los niveles de LC3 II aumentaron. En estas mismas condiciones se midieron los niveles de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, como controles del proceso de NED. Este resultado demuestra, por un lado, que la autofagia

es activa en células NE, ya que se produce disminución de los niveles de p62 y por otro lado, que durante la NED se produce un aumento en el número de autofagosomas ya que el acúmulo de LC3 II es mayor en células NE con respecto a células LNCaP.

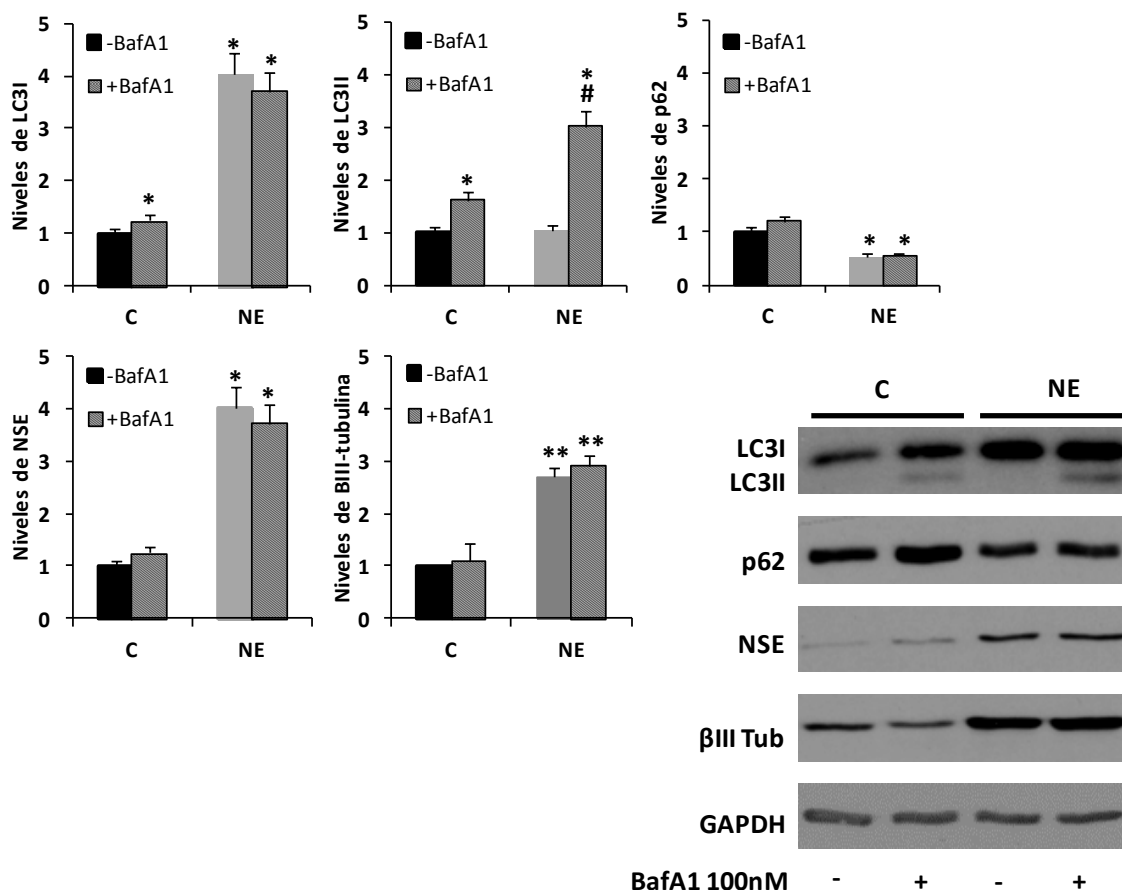


Figura 36. Marcadores de autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

Para confirmar la conclusión anterior se midieron los niveles de expresión de ARNm de LC3 y de algunos genes claves en el proceso de autofagia como son Atg1 (ULK1/2 en mamíferos) y Atg5. Como se observa en la figura 37, en las células NE se produce un aumento de la expresión de LC3, Atg1 y Atg5. Con este resultado se pone en evidencia que durante la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP hay un aumento en la expresión de estos genes y permite confirmar que la autofagia se activa en este proceso.

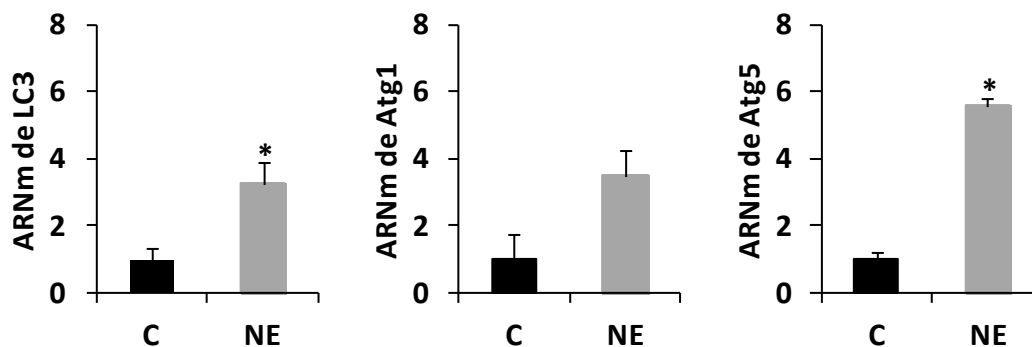


Figura 37. Aumento de ARNm de marcadores de autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. ARNm correspondiente a LC3, Atg1 y Atg5 medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).

5.2. Aumento de la expresión de LAMP2 durante la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

Previamente a esta tesis doctoral, en nuestro laboratorio se realizó un microarray de expresión de células LNCaP neurodiferenciadas. En el microarray se comparó la expresión génica de células LNCaP con respecto a células LNCaP cultivadas sin suero durante 6 días a las que se consideró células neuroendocrinas (NE). Entre las proteínas que mostraban un cambio en su patrón de expresión se encontraba LAMP2.

Para validar el resultado obtenido en el microarray se determinó, en primer lugar, el nivel de ARNm de LAMP2 en células LNCaP y células NE en nuestro modelo experimental. En la figura 38A se observa que se produce un incremento en el ARNm de esta proteína en las células NE con respecto a las células LNCaP, resultado que permitió confirmar el dato obtenido en el microarray. Posteriormente, se midió el nivel proteico de LAMP2 utilizando un anticuerpo que reconoce las tres isoformas de LAMP2. Las células LNCaP mostraron una banda a 96 KDa, en tanto que el perfil electroforético cambió en células NE donde aparecieron formas truncadas y de degradación de la proteína LAMP2 de menor peso molecular (Figura 38B). En estas mismas condiciones se midieron los niveles de los marcadores NSE y β III Tub, como controles del proceso de NED.

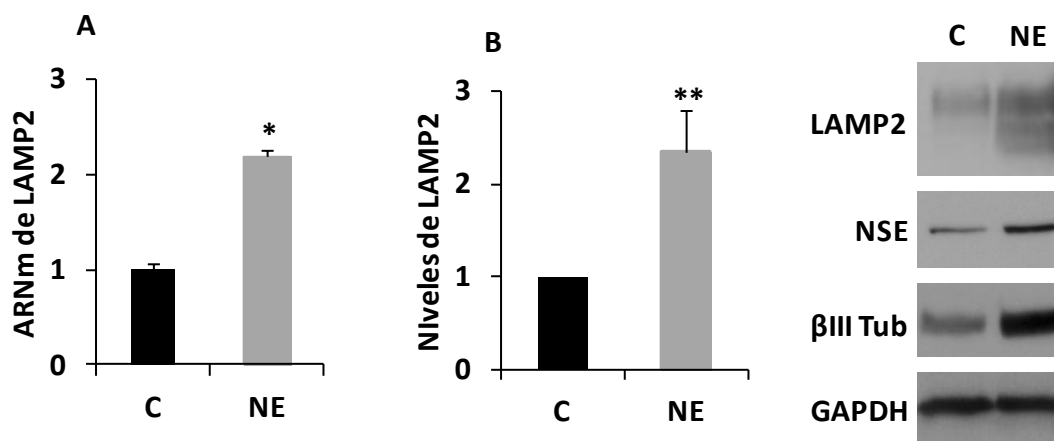


Figura 38. Aumento de LAMP2 durante la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** ARNm correspondiente a LAMP2 medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. **B.** Niveles de LAMP2, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control).

Mediante microscopía confocal de fluorescencia se analizó la localización celular de LAMP2 utilizando un anticuerpo primario anti-LAMP2 y un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa 488. Como se observa en la figura 39, en células LNCaP la señal se localiza de manera homogénea alrededor del citoplasma delimitando estructuras cilíndricas similares a anillos. En células NE la intensidad de la señal aumenta y se observa además, una localización en los extremos de las prolongaciones tipo neurita. En otra serie de ensayos de microscopía confocal se determinó la localización lisosomal de LAMP2, para lo cual las células fueron marcadas en iguales condiciones que las citadas para la figura 39 y con la sonda fluorescente LysoTracker®. Esta sonda es capaz de unirse y marcar aquellas estructuras celulares con pH ácido (endosomas tardíos, lisosomas). En la figura 40 puede observarse que, tanto en células LNCaP como en células NE, aparecen puntos de color naranja-amarillo que son el resultado de la combinación del fluorocromo Alexa 488 verde y la sonda fluorescente LysoTracker® roja. En los extremos de las prolongaciones tipo neurita, por otro lado, predomina claramente la señal de color verde. Estos resultados permiten confirmar que durante la NED de las células LNCaP hay un aumento de la expresión génica y proteica de LAMP2 y que dicha proteína tiene una doble distribución en células NE, en orgánulos de pH ácido y en las prolongaciones tipo neurita.

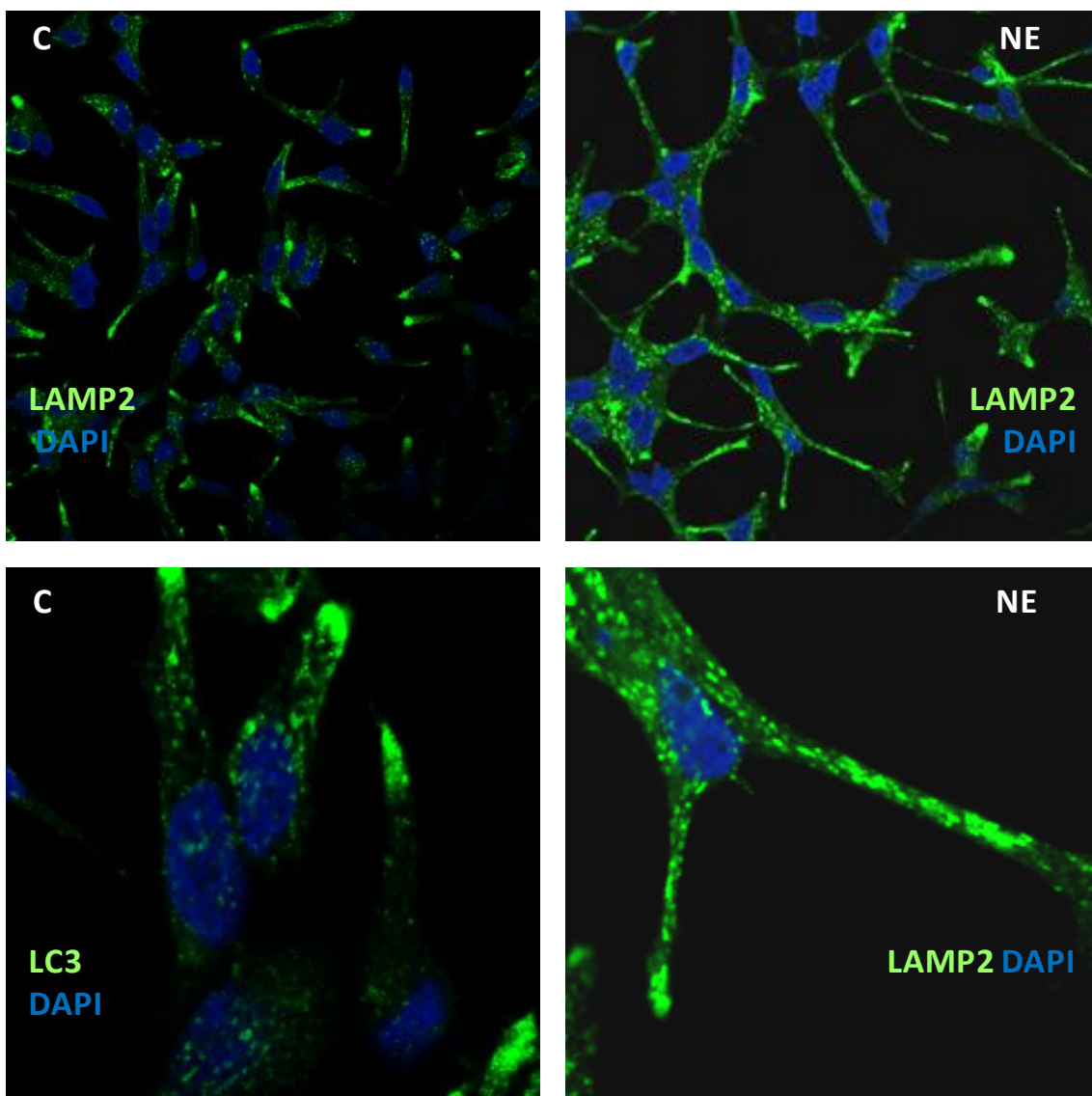


Figura 39. Localización celular de LAMP2 durante la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Localización de LAMP2 (verde) en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) analizada mediante microscopía confocal de fluorescencia (20X panel superior, 63X panel inferior). Los núcleos están marcados con DAPI (azul).

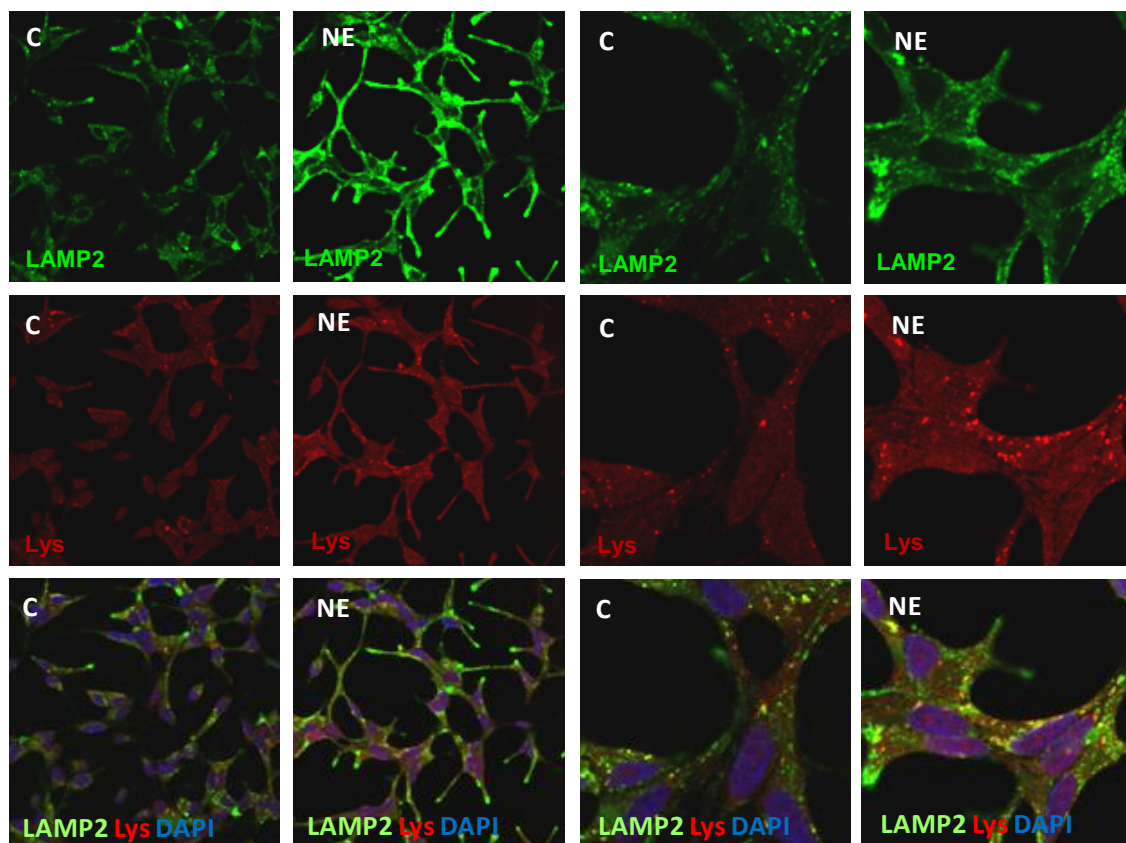


Figura 40. Localización de LAMP2 en lisosomas durante la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Localización de LAMP2 (verde) en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) analizada mediante microscopía confocal de fluorescencia (20X panel izquierdo, 63X panel derecho). Los núcleos están marcados con DAPI (azul). Los lisosomas se marcaron con la sonda fluorescente LysoTracker® (Lys, rojo) tratando las células con una dosis de 50 nM durante los últimos 30 minutos.

5.3. Efecto de la inhibición de la autofagia sobre la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP.

Los resultados obtenidos en relación con la activación de la autofagia nos condujeron a plantearnos si este proceso sería necesario para que se produjera la diferenciación neuroendocrina.

Para analizar el efecto de la inhibición del proceso autofágico sobre la NED de las células LNCaP, en primer lugar, se estudió el efecto de la inhibición mediante bafilomicina A1. Para ello se utilizó una dosis de BafA1 de 2nM que, como se comentó anteriormente, impide la acidificación de lisosoma. La figura 41 recoge los resultados obtenidos al tratar tanto células LNCaP como NE con BafA1 2nM durante 6 días. Este tratamiento aplicado desde el inicio de la retirada de suero, produjo un acúmulo de p62 y un aumento de LC3 II, indicando que no se estaba produciendo degradación del contenido lisosomal. En estas condiciones no se observó una modificación de los marcadores neuroendocrinos, NSE y β III Tub, por lo que se puede concluir que la inhibición de la autofagia con bafilomicina A1 no altera la adquisición de NED en células LNCaP.

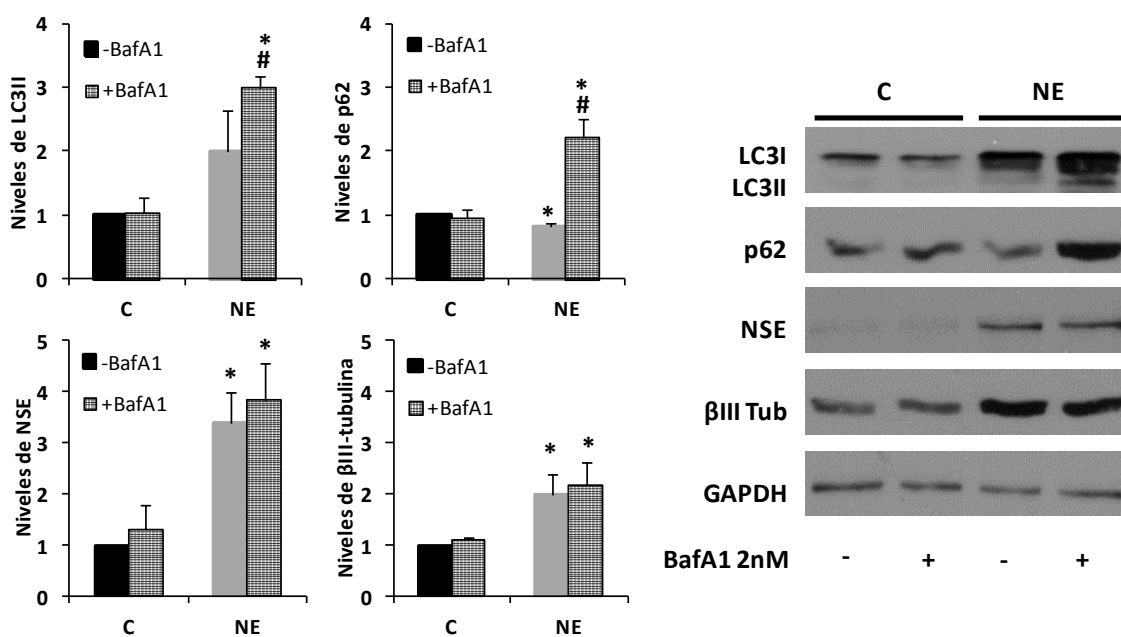


Figura 41. Efecto de la inhibición de la autofagia con bafilomicina A1 sobre la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con bafilomicina A1 2nM (BafA1). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a NE).

Posteriormente, se analizó efecto de 3-metiladenina (3-MA), inhibidor de la PI3K III que actúa en la nucleación de la autofagia. Para ello se añadió 3-MA desde el principio de la retirada de suero y se midieron los marcadores de autofagia LC3 y p62, así como los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub. En la figura 42 se observa que el tratamiento con 3-MA induce una disminución de LC3 II, como consecuencia de la inhibición de la formación del autofagosoma y un consecuente acúmulo de p62 que no puede ser degradado en estos orgánulos. En estas condiciones se produjo una disminución de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, lo que indicaba que el inhibidor 3-MA impedía la NED en las células LNCaP.

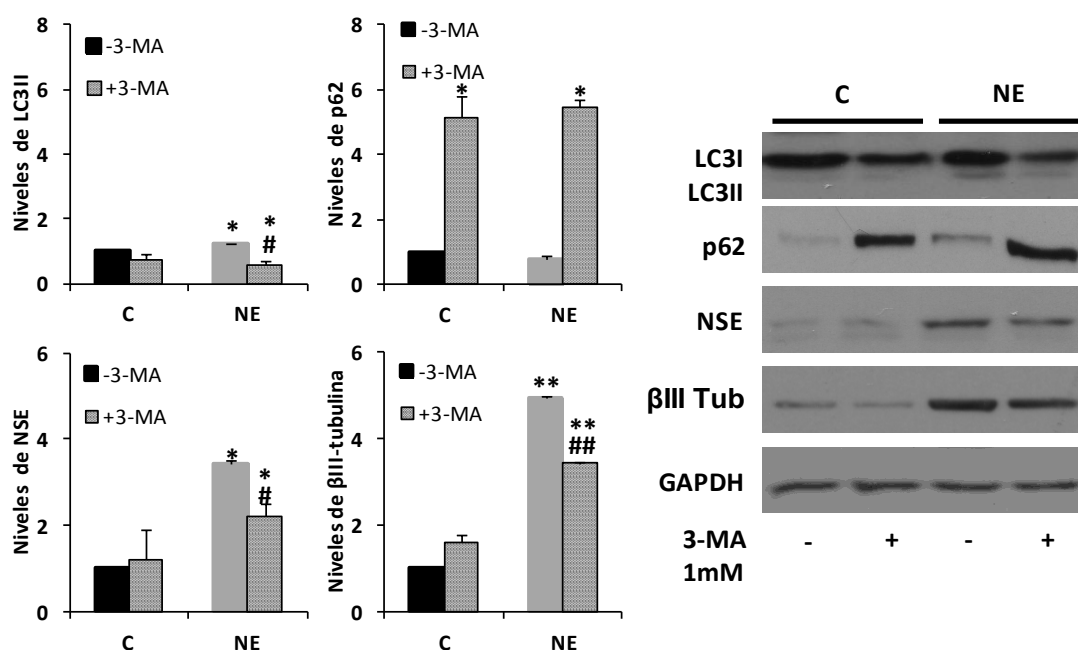


Figura 42. Efecto de la inhibición de la autofagia con 3-metiladenina sobre la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con 3-metiladenina 1mM (3-MA). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* p <0,05 y ** p <0,01 con respecto al control; # p <0,05 y ## p <0,01 respecto a NE).

Para analizar en mayor profundidad el papel de la autofagia en la NED, se silenció la proteína Atg5 que interviene en la elongación del autofagosoma. La anulación de la expresión de Atg5 produjo, por un lado, aumento de los niveles de LC3 II y p62, y por otro lado, una disminución en los niveles de marcadores de NED que solo fue significativa en el caso de NSE (Figura 43).

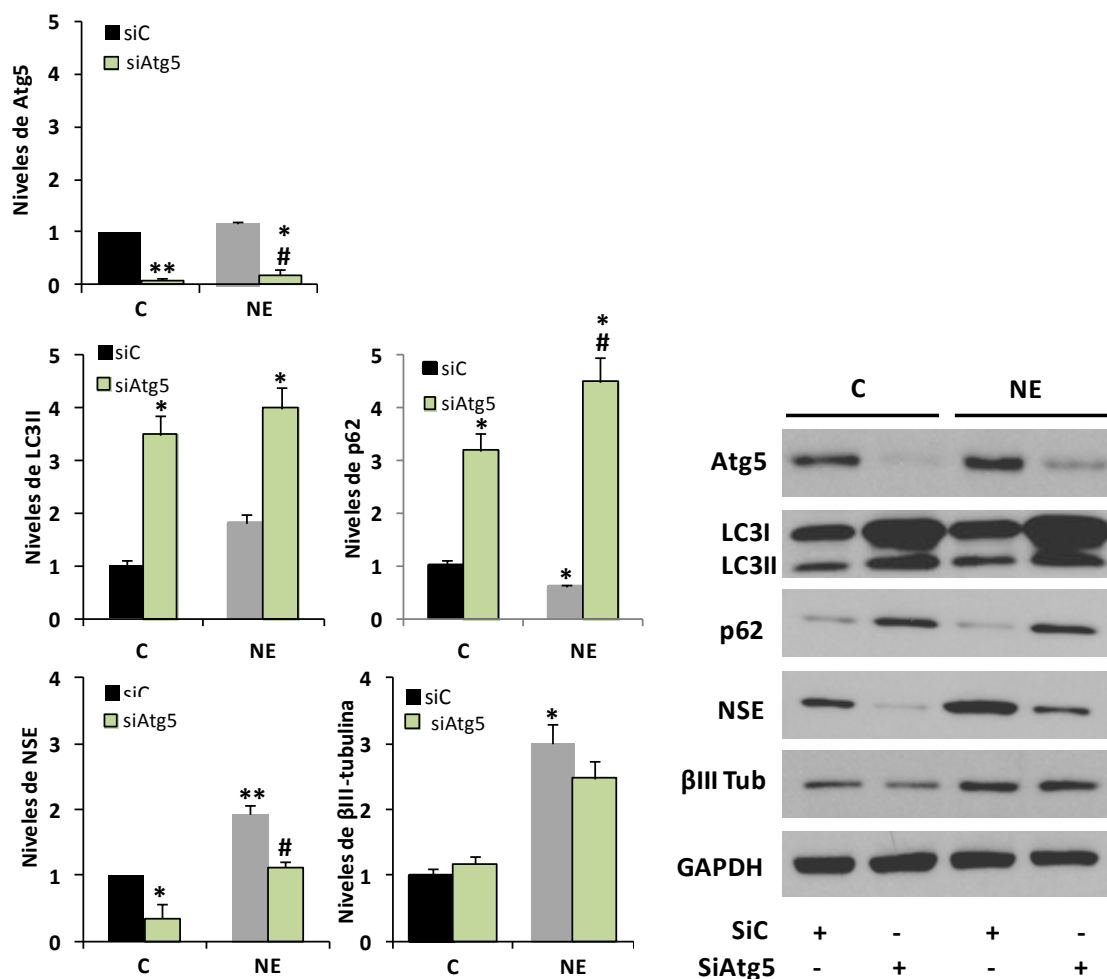


Figura 43. Efecto del silenciamiento de Atg5 sobre la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron, silenciaron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de Atg5, LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron transfectadas con ARN de interferencia control (siC) o con ARN de interferencia selectivo para Atg5 (siAtg5). Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ respecto a NE).

Estos resultados, en conjunto, ponen en evidencia que la inhibición farmacológica de la autofagia con 3-MA y el silenciamiento génico de Atg5, no así el tratamiento con dosis bajas de BafA1, impiden la NED de las células LNCaP y que la actividad de este proceso es necesaria para el desarrollo de la NED.

5.4. Efecto de la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR sobre la autofagia.

Entre las funciones que la vía PI3K/Akt/mTOR regula se encuentra la autofagia. Puesto que se había observado una activación de esta vía en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP, analizamos el efecto de su inhibición sobre la autofagia. Utilizando las mismas condiciones en las que se estudió la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR en la NED de las células LNCaP y tratándolas con bafilomicina A1 durante las últimas 3 horas, medimos los niveles de marcadores de autofagia LC3 y p62, junto con los niveles del marcador neuroendocrino NSE.

En primer lugar, se analizó el efecto de LY294002. Cuando las células fueron tratadas con LY294002 durante 6 días y bafilomicina A1 durante las últimas 3 horas, se observó un aumento de LC3 II. Por su parte, los niveles de p62 aumentaron notablemente en las células NE y en estas condiciones los niveles de NSE disminuyeron. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la inhibición de PI3K I produce un bloqueo de la autofagia que se refleja en el aumento de LC3 II y p62, y dicho bloqueo produce la disminución del marcador neuroendocrino NSE (Figura 44).

En segundo lugar, se analizó el efecto del inhibidor de Akt IV. Igualmente que con LY294002, el tratamiento con Akt inh IV fue capaz de producir un aumento de LC3 II y de p62 en células NE, indicando que era capaz de producir una inhibición del proceso de autofagia. Además, se analizó el efecto de este inhibidor sobre la expresión de la proteína LAMP2, observándose que se producía una notable disminución de los niveles de LAMP2 en células NE. En estas condiciones se produjo una disminución del marcador neuroendocrino NSE (Figura 45).

En tercer lugar, se analizó el efecto del inhibidor de mTORC1, rapamicina. A diferencia de lo observado con LY294002 o con Akt inh IV, el tratamiento con rapamicina no modificó los niveles de LC3 II ni de p62 en células NE. Sin embargo, sí produjo una disminución del marcador de diferenciación neuroendocrina NSE (Figura 46).

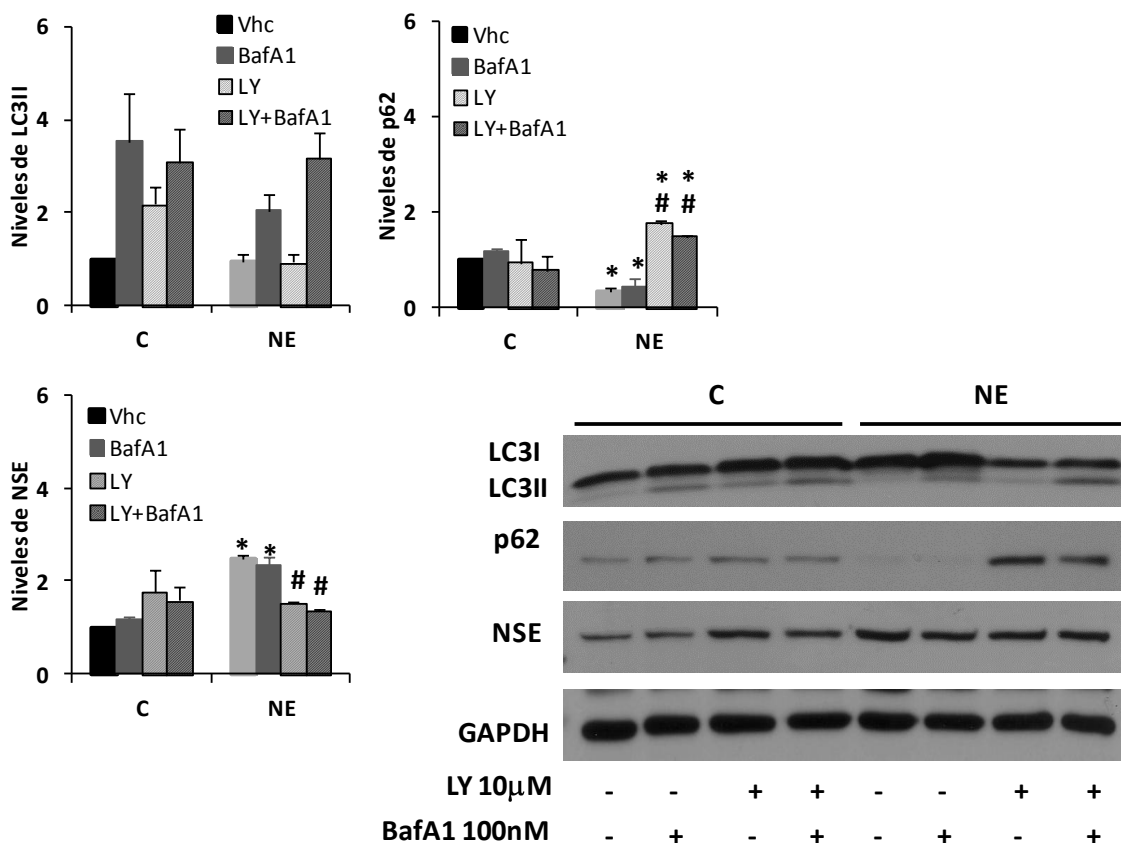


Figura 44. Efecto de LY294002 sobre la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con LY294002 10µM (LY) y con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes (*p<0,05 con respecto al control; # p<0,05 respecto a NE).

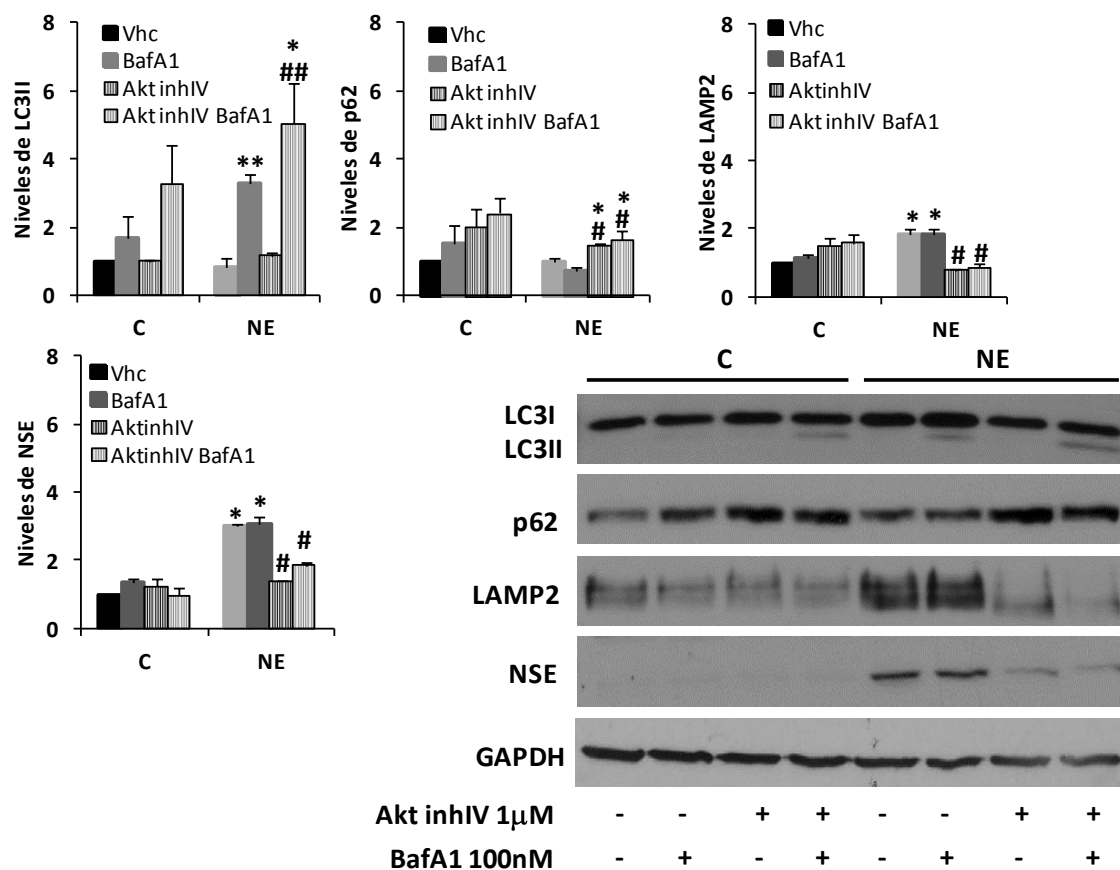


Figura 45. Efecto del inhibidor de Akt IV sobre la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, LAMP2, enolasa específica de neuronas (NSE) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con el inhibidor de Akt IV 1µM (Akt inh IV) y con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

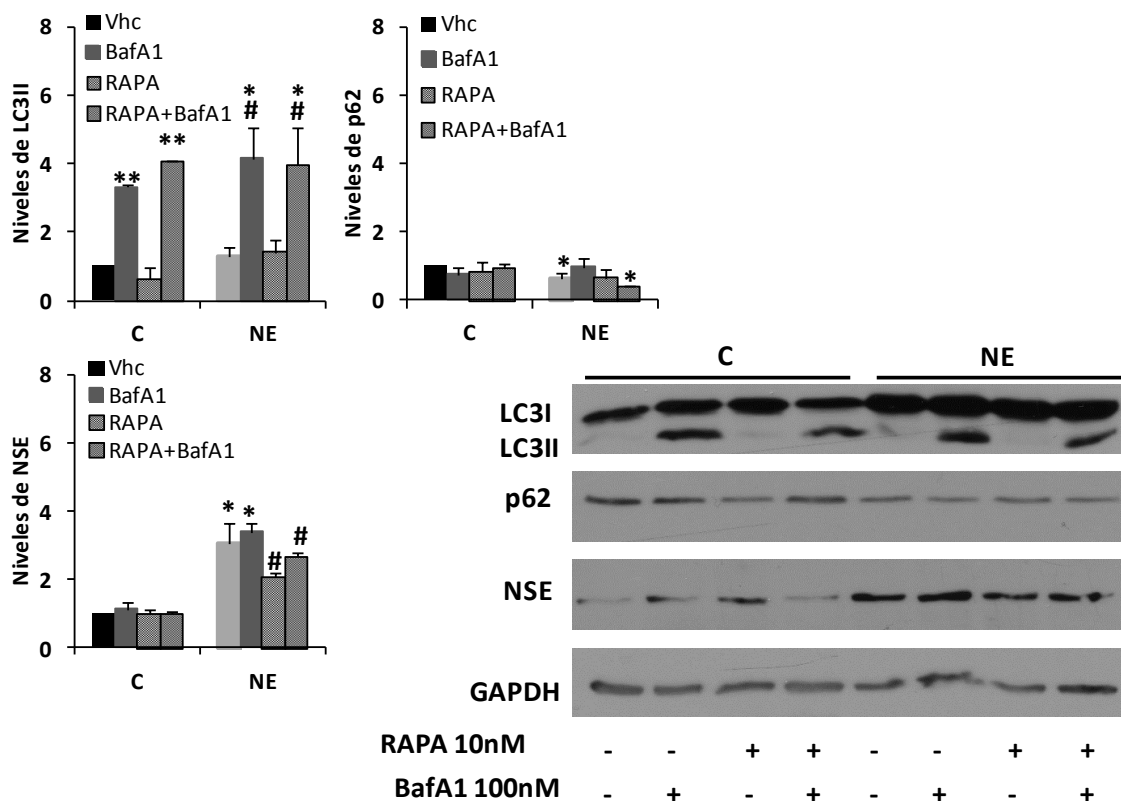


Figura 46. Efecto de rapamicina sobre la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con rapamicina 10nM (RAPA) y con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

5.5. Efecto de la inhibición de LAMP2 sobre la autofagia.

Apoyándonos en datos publicados previamente (Tanaka et al. 2000; Massey et al. 2006), quisimos comprobar si el silenciamiento de LAMP2 producía una modificación de la autofagia y su efecto sobre la NED de las células LNCaP.

En primer lugar, se realizó el silenciamiento de LAMP2 y se midieron los niveles de LAMP2 y de los marcadores de NED, NSE y β III Tub. Dicho silenciamiento, altamente efectivo para la proteína LAMP2, fue capaz de impedir el aumento del marcador neuroendocrino β III Tub (Figura 47).

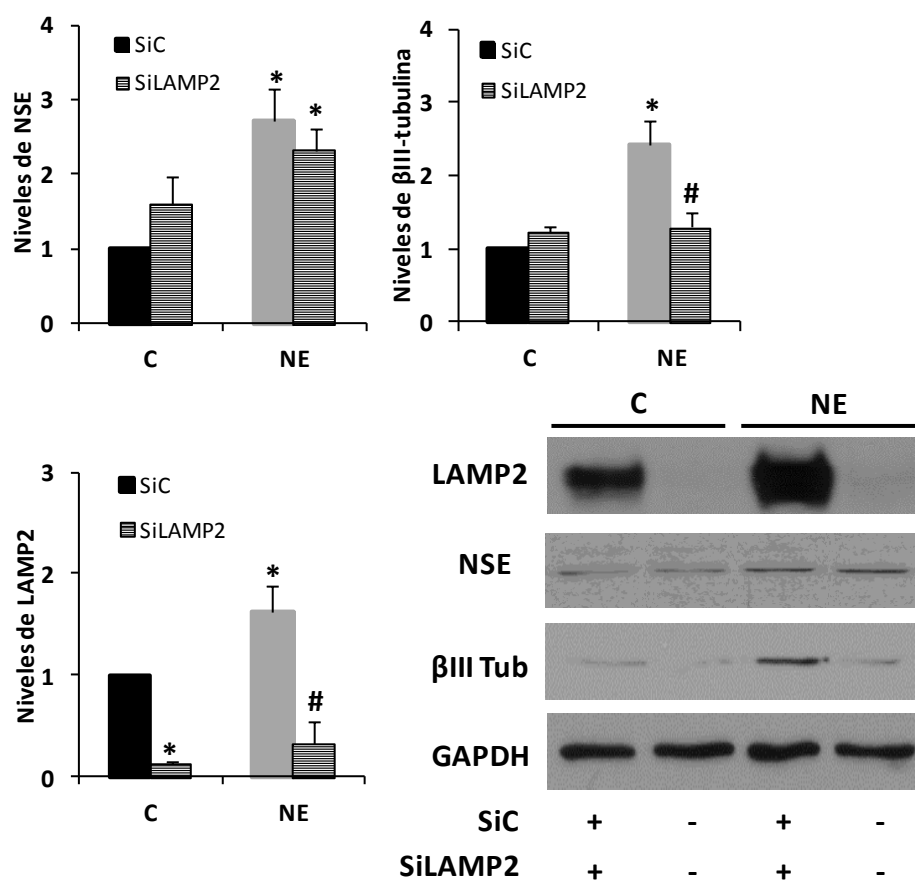


Figura 47. Efecto del silenciamiento de LAMP2 sobre la diferenciación neuroendocrina en células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron, se silenciaron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LAMP2, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron transfectadas con ARN de interferencia control (siC) o con ARN de interferencia selectivo para LAMP2 (siLAMP2). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

Posteriormente, se evaluó el efecto del silenciamiento de LAMP2 sobre la autofagia. Para ello, durante el silenciamiento de LAMP2 se añadió bafilomicina A1 durante las últimas 3 horas y se midieron los niveles de LC3 y p62 observándose que cuando LAMP2 estaba silenciado se producía un aumento de LC3 y p62 en las células NE. Estos resultados indicaban que el silenciamiento de LAMP2 inducía un bloqueo de la autofagia. El nivel de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, utilizados como control del proceso de NED, solo disminuyó en el caso de β III Tub (Figura 48).

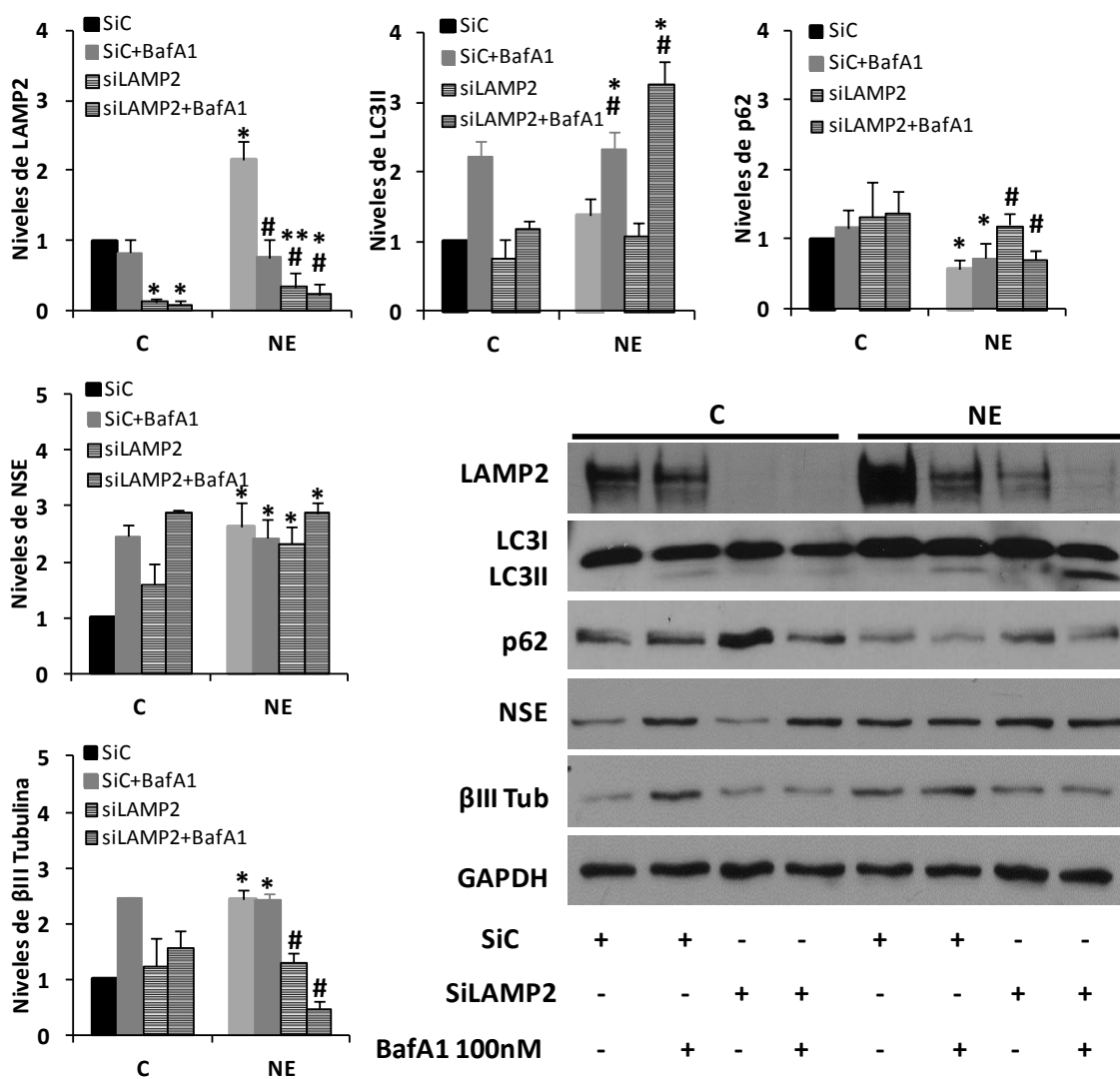


Figura 48. Efecto del silenciamiento de LAMP2 sobre la autofagia y la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron, se silenciaron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LAMP2, LC3, p62, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron transfectadas con RNA de interferencia control (siC) o con RNA de interferencia selectivo para LAMP2 (siLAMP2). En los casos indicados, las células fueron tratadas con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

5.6. Efecto de la activación de AMPK sobre la autofagia.

Como habíamos visto que se producía una inhibición de AMPK en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP, quisimos evaluar su relación con el proceso de autofagia.

Para ello, en primer lugar, se incubaron las células con el activador de AMPK, AICAR, durante 1, 4 y 24 horas. En la figura 49 puede observarse que el tratamiento con AICAR a estos tiempos, no induce cambios significativos en los niveles de los marcadores de autofagia LC3 y p62.

Posteriormente, se analizó el efecto de la activación de AMPK sobre la autofagia en las condiciones establecidas de tiempo y eliminación de suero para nuestro modelo celular de NED. Cuando el tratamiento con AICAR se prolongó durante 6 días, fue capaz de inducir aumento de LC3 II y p62, efecto que fue más evidente cuando se trataron las células con bafilomicina A1 (Figura 50). Estos resultados demuestran que la activación de AMPK con AICAR produce un bloqueo de la autofagia que en las células NE se correlaciona con una disminución del marcador neuroendocrino β III Tub, valorado como control del proceso de NED.

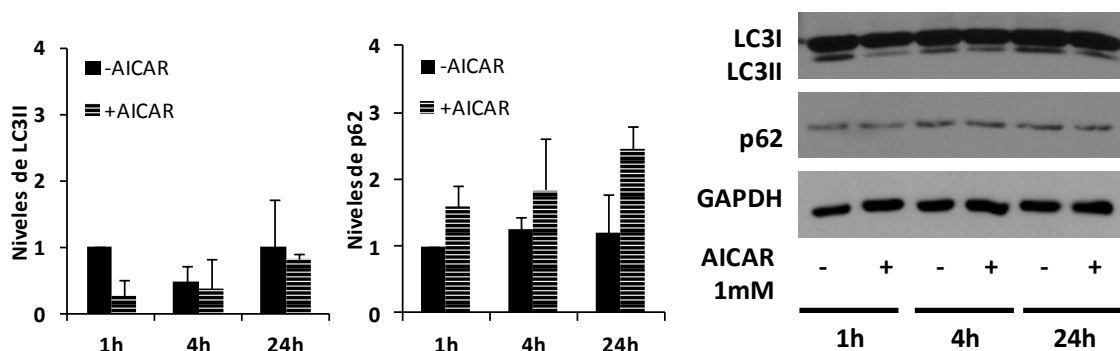


Figura 49. Efecto del tratamiento con AICAR sobre la autofagia células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en ausencia de suero durante 1, 4 y 24 horas. Niveles de LC3, p62 y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot*. En los casos indicados las células fueron tratadas durante 1, 4 y 24 horas con AICAR 1mM. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes.

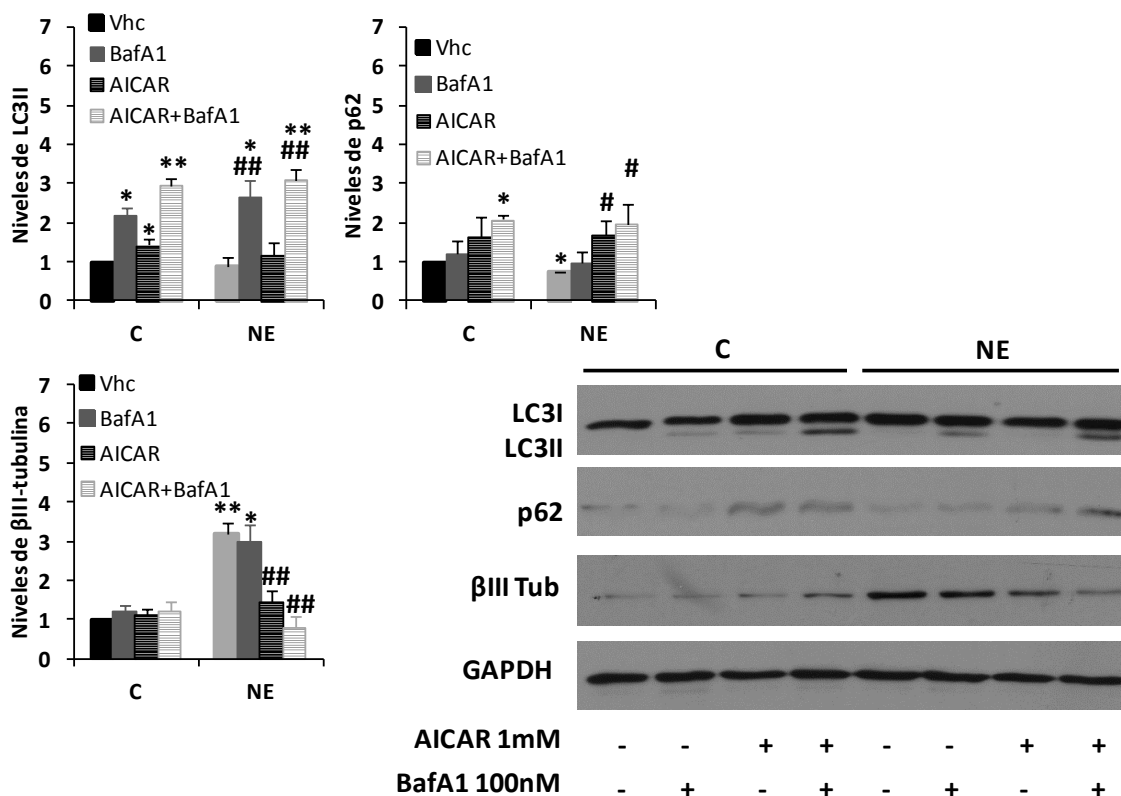


Figura 50. Efecto de la activación de AMPK sobre la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de LC3, p62, betaIII-tubulina (betaIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* células LNCaP control (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con AICAR 1mM y con bafilomicina A1 100 nM (BafA1) durante las últimas 3 horas. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto a NE).

En conjunto estos resultados están en concordancia con los obtenidos en relación a las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y AMPK, previamente estudiadas en nuestro modelo experimental y en conjunto permiten concluir que la activación de Akt produce una inhibición de AMPK que induciría una activación del proceso de autofagia y consecuentemente de la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP.

6. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN).

6.1. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en células LNCaP y células neuroendocrinas.

La expresión de los principales componentes del sistema endocannabinoide en la próstata ha sido descrita por el grupo de investigación de la Dra. Díaz-Laviada en el que se ha realizado este trabajo de tesis doctoral (Ruiz-Llorente et al. 2003; Ruiz-Llorente et al. 2004). Como se ha comentado en la introducción, en la próstata humana se expresan varios de los componentes del sistema endocannabinoide incluyendo a los receptores CB1 y CB2. La expresión de estos receptores, fundamentalmente de CB1, aumenta en el cáncer de próstata, y la activación de CB2 parece mediar los efectos antiproliferativos de los cannabinoides en células tumorales de próstata (Olea-Herrero et al 2009a). Sin embargo, se desconoce si los receptores de cannabinoides ejercen algún papel en la diferenciación neuroendocrina del cáncer de próstata.

Al comienzo de esta tesis doctoral no había publicaciones científicas que establecieran los niveles de los receptores de cannabinoides en las células NE del cáncer de próstata. Por tal motivo, para estudiar este punto se determinaron los niveles de ARNm de CB1 y CB2 mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Como se observa en la figura 51A, en células NE se producía una marcada disminución del ARNm tanto de CB1 como de CB2 con respecto a células LNCaP. Se quiso, así mismo, corroborar si esta disminución en los niveles de ARNm se relacionaba con una disminución en la expresión proteica de ambos receptores. Debido a algunos inconvenientes técnicos con el anticuerpo utilizado para detectar CB1, no fue posible establecer el nivel de expresión proteica de este receptor. Sin embargo, en el caso de del receptor CB2 si se pudo corroborar que se producía una disminución del receptor CB2 apreciable desde el segundo día de la retirada de suero (Figura 51B). Es interesante destacar que la disminución de CB2 se correlaciona con el aumento de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub.

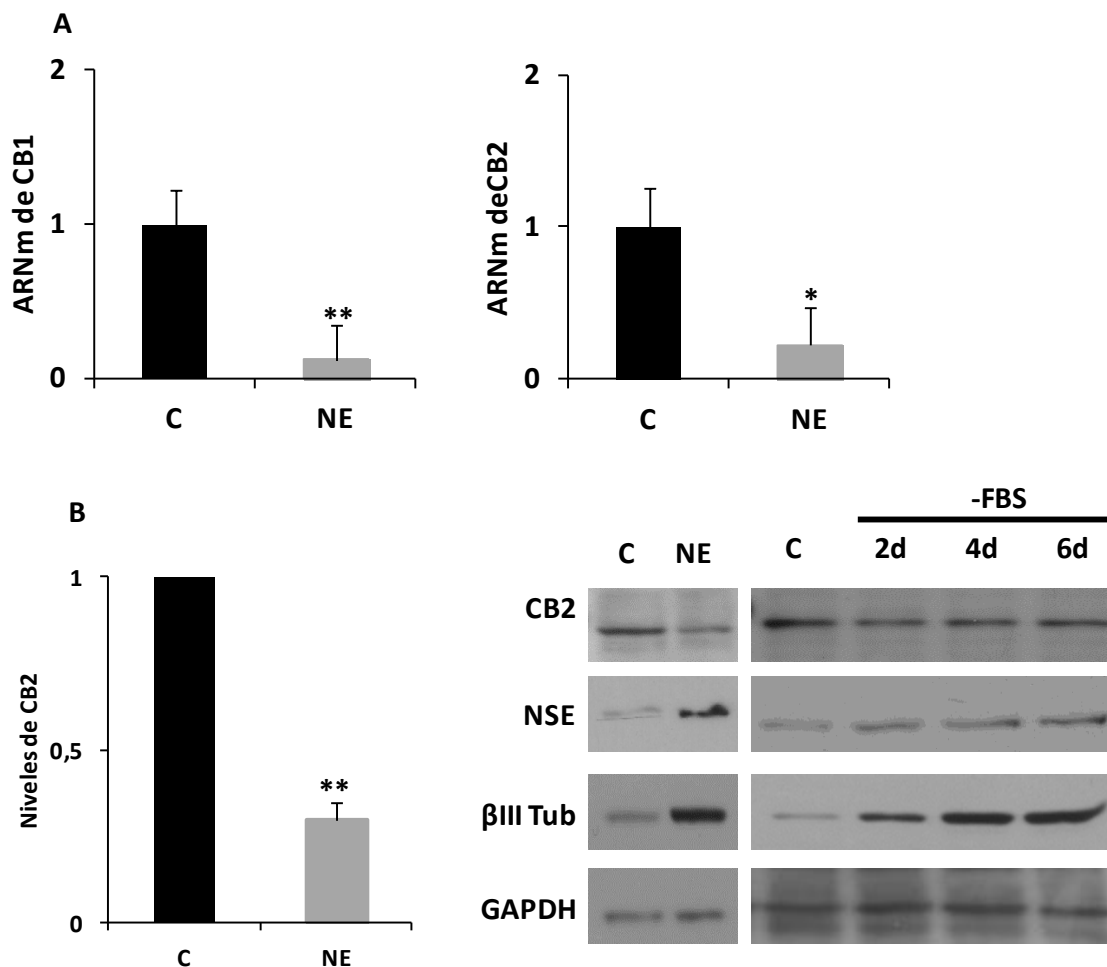


Figura 51. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** ARNm correspondiente a CB1 y CB2 medidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con los niveles de ARNm de GAPDH. **B.** Niveles de CB2, enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y durante 2, 4 y 6 días sin suero (-FBS). Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control).

6.2. El cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) disminuye la viabilidad de células LNCaP y de células neuroendocrinas.

La disminución de los receptores de cannabinoides parecía indicar que el sistema cannabinoide podría tener algún papel en la diferenciación neuroendocrina. Para comprobar esto se utilizó el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (WIN), que posee afinidad por los receptores CB1 y CB2 y se evaluaron diferentes aspectos de la NED.

Las células LNCaP y las células NE se trataron con dosis crecientes de WIN durante 48 horas y se determinó la viabilidad celular mediante ensayo de MTT. La figura 52 muestra el efecto obtenido en ambos tipos celulares. El efecto sobre la viabilidad celular fue similar en ambos casos, siendo un poco más acusado en células NE, permitiendo establecer la dosis que inhibe el 50% de viabilidad celular (IC_{50}) en $3\mu M$ de WIN. Aunque previamente se había observado que en las células NE se producía una disminución de los niveles de receptores de CB1 y CB2, decidimos analizar si el efecto de WIN sobre la viabilidad celular estaba mediado por dichos receptores. Para tal fin tanto las células LNCaP como NE fueron pretratadas durante dos horas con el agonista inverso de CB1 SR141716A (SR1), o con el agonista inverso de CB2 SR144528 (SR2) o con la combinación de ambos. Estos experimentos mostraron que en ninguno de los pretratamientos con los agonistas inversos se producía una modificación del efecto de WIN sobre la viabilidad celular, y que por lo tanto el efecto del cannabinoide no parecía estar mediado por los receptores.

6.3. El cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) disminuye la expresión de marcadores neuroendocrinos.

El paso siguiente fue evaluar si el cannabinoide WIN tenía algún efecto sobre la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP. Para ello tanto células LNCaP como NE se trataron con WIN durante 6 días a la dosis establecida en el experimento anterior, y en los casos indicados fueron pretratadas con la combinación de los agonistas inversos SR1 y SR2. Posteriormente, se analizaron los niveles de los marcadores neuroendocrinos NSE y βIII Tub. Como se observa en la figura 53, el tratamiento con WIN disminuyó la expresión de ambos marcadores en células NE, y este efecto no se vio alterado cuando las células recibieron tratamiento previo con la combinación de agonistas inversos.

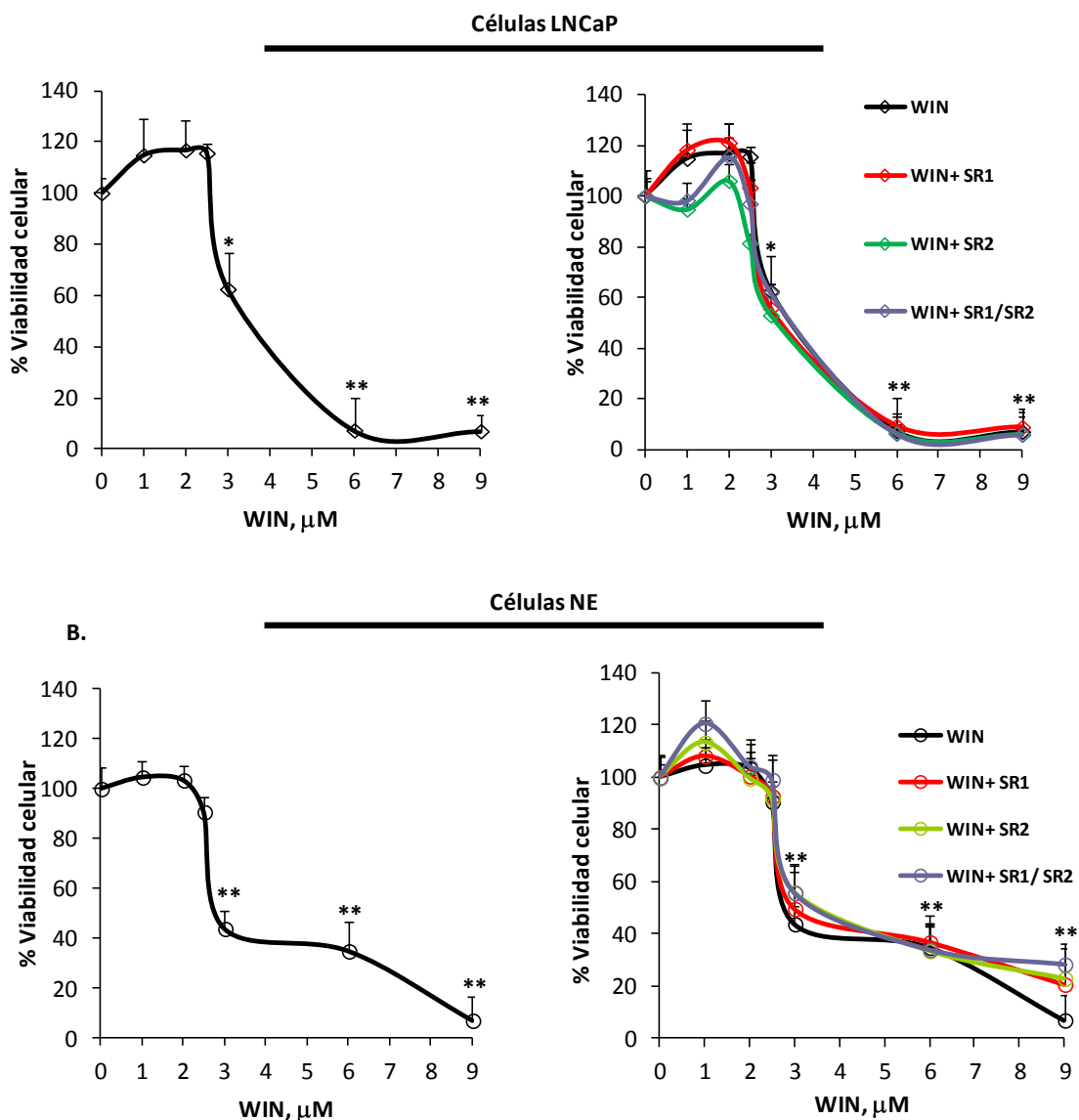


Figura 52. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la viabilidad de células LNCaP (A) y células neuroendocrinas (B). Las células LNCaP y células neuroendocrinas (NE) se trataron con dosis crecientes de WIN durante 48 horas y la viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ del agonista inverso SR141716A (SR1), SR144528 (SR2) o con la combinación de ambos. El tratamiento $0\mu\text{M}$ (solo vehículo) se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control $0\mu\text{M}$).

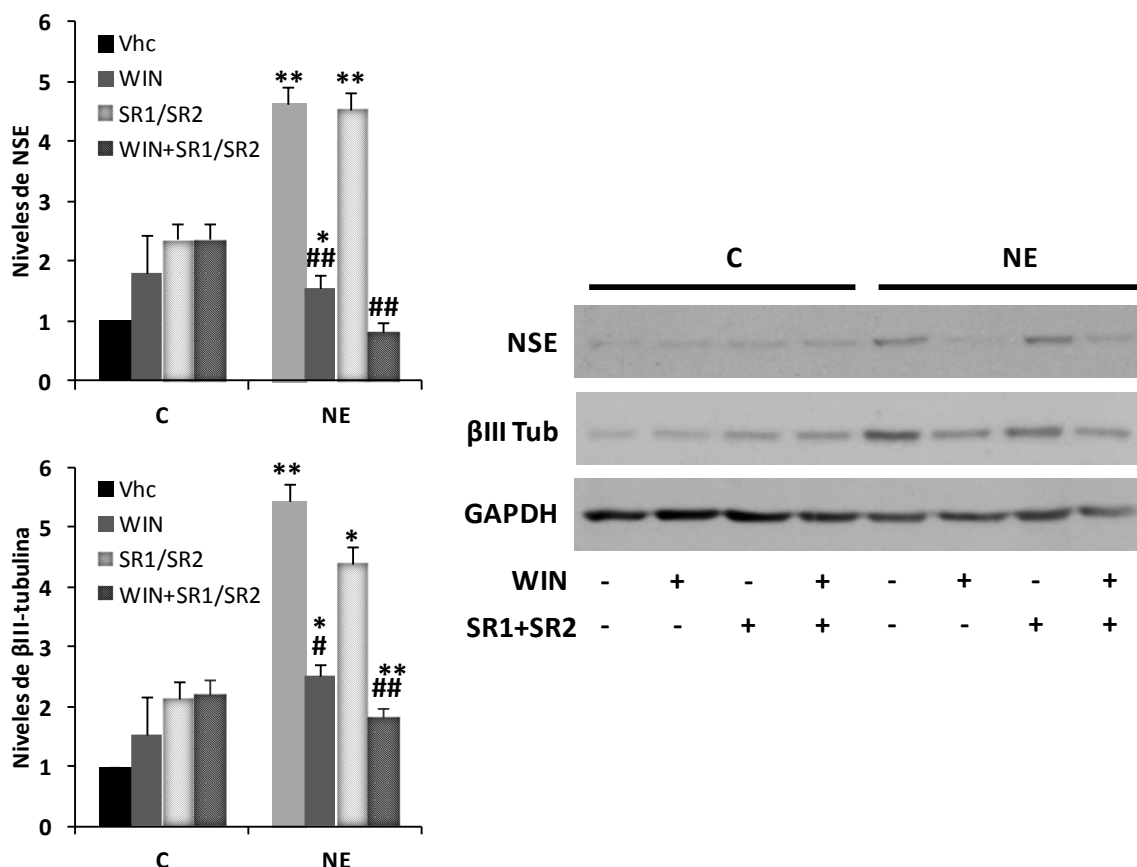


Figura 53. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la expresión de marcadores neuroendocrinos en células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ de la combinación de los agonistas inversos SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2) y durante 6 días con WIN $3\mu\text{M}$. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cinco experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto a NE).

Con el resultado obtenido anteriormente, se consideró interesante analizar si WIN tendría algún efecto sobre la expresión de los receptores CB1 y CB2. Para ello medimos los niveles de ARNm de los receptores de CB1 y CB2 en las mismas condiciones que en el experimento mostrado en la figura 53. Como se observa en la figura 54, los niveles de CB1 disminuyen en las NE tanto en ausencia como en presencia de WIN y por lo tanto este cannabinoide no modifica el perfil de expresión de CB1. Sorprendentemente no ocurre así con los niveles de CB2. El tratamiento con WIN evita la caída de expresión de CB2 que se produce en la NED, indicando que el tratamiento durante 6 días con WIN mantiene los niveles de receptor CB2 similares a los presentes en células LNCaP y sugiere que CB2 podría estar implicado en la disminución de la NED producida por WIN. Al pretratar con los agonistas inversos SR1 y SR2 se evita el efecto de WIN sobre CB2. En conjunto, estos resultados sugieren que la disminución de CB2 juega un papel en la diferenciación neuroendocrina y que WIN actuando a través de CB2, evitaría la caída de este receptor y disminuiría la NED.

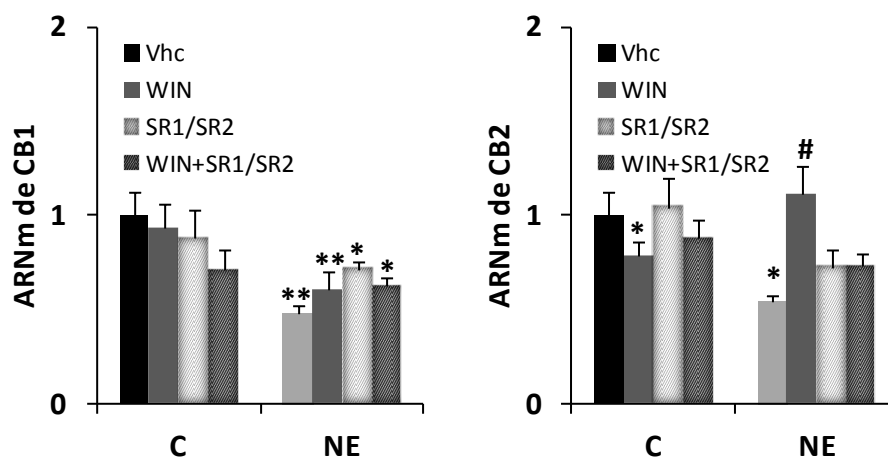


Figura 54. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la expresión de receptores de cannabinoides CB1 y CB2. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. ARNm correspondiente a CB1 y CB2 medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). Los valores fueron normalizados con ARNm de GAPDH. En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ del agonista inverso SR141716A (SR1), SR144528 (SR2) o con la combinación de ambos y durante 6 días con WIN $3\mu\text{M}$. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

6.4. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y AMPK en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

Como se ha visto, el tratamiento con WIN producía disminución de la expresión de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub en células NE. Por lo tanto, se planteó analizar si WIN estaría ejerciendo este efecto a través de alguna de las vías de señalización estudiadas previamente. Con este objetivo, se comenzó estudiando el efecto de este cannabinoide sobre la vía PI3K/Akt/mTOR. El tratamiento con WIN fue capaz de producir una disminución de la fosforilación de Akt en células NE, incluso a niveles menores que los de las células LNCaP. Como era de esperar, esto se correlacionó con una disminución de la fosforilación de mTOR y de S6. Curiosamente el tratamiento con WIN solo afecta a la vía PI3K/Akt/mTOR en células NE pero no en las células LNCaP. El tratamiento con los agonistas inversos de CB1 y CB2, SR1 y SR2 respectivamente, dos horas antes de la adición de WIN, no previno la inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR (Figura 55).

En segundo lugar se estudió el efecto de WIN sobre AMPK en las mismas condiciones en las que se estudió la vía PI3K/Akt/mTOR. El tratamiento con WIN fue capaz de inducir un aumento en la fosforilación de AMPK y de ACC, que no fue evitado con la adición de SR1 y SR2 (Figura 56).

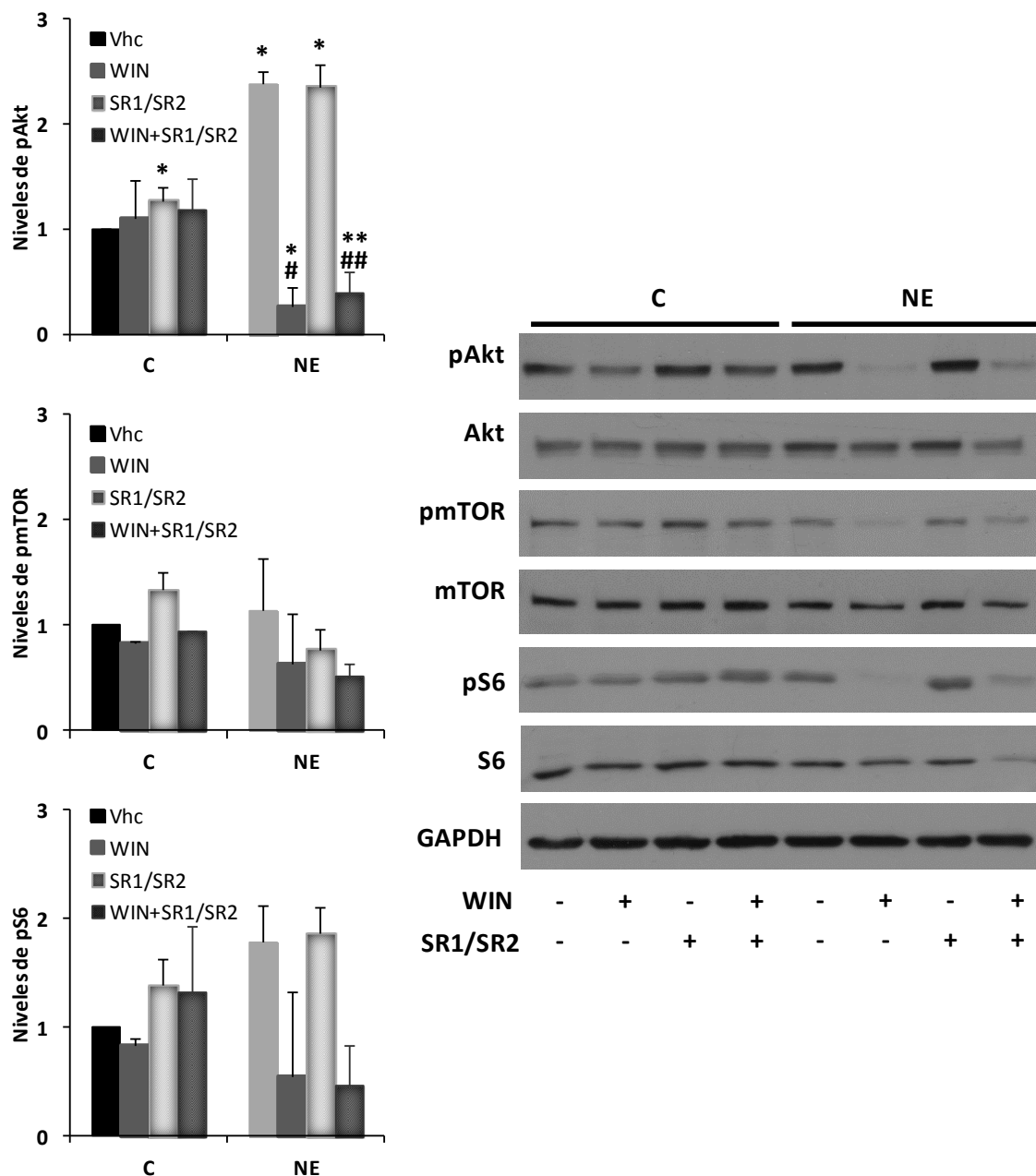


Figura 55. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de pAkt, Akt, pmTOR, mTOR, pS6, S6 y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ de la combinación de los agonistas inversos SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2) y durante 6 días con WIN $3\mu\text{M}$. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de cuatro experimentos independientes (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$ con respecto al control; # $p < 0,05$ y ## $p < 0,01$ con respecto a NE).

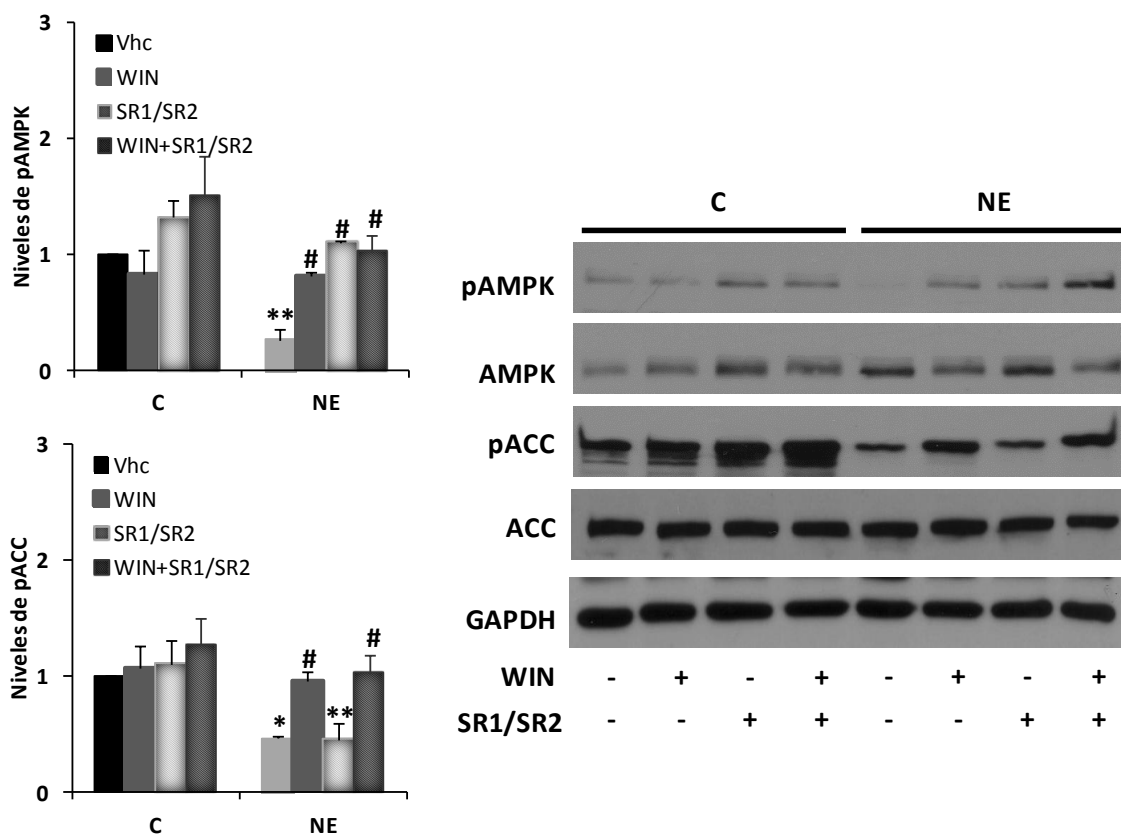


Figura 56. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre AMPK en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de pAMPK, AMPK, pACC, ACC y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con 1µM de la combinación de los agonistas inversos SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2) y durante 6 días con WIN 3µM. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de cinco experimentos independientes (*p<0,05 y **p<0,01 con respecto al control; # p<0,05 con respecto a NE).

Tomados en conjunto estos resultados permiten establecer que el tratamiento con WIN produce una inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR y una activación de AMPK. Esta situación estaría en correlación con la disminución de la expresión de los marcadores neuroendocrinos NSE y βIII Tub.

Con el objetivo de estudiar si el efecto de WIN sobre la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP estaba mediado por AMPK, realizamos el silenciamiento génico de esta proteína y posteriormente se trató con WIN (Figura 57). Sorprendentemente, el silenciamiento de AMPK redujo notablemente los marcadores de diferenciación neuroendocrina tanto en las células LNCaP control como en las NE y este efecto se mantuvo en los casos en que las células recibieron tratamiento con WIN. Este resultado, si bien preliminar, no nos permite asegurar que WIN ejerza su efecto inhibitor de la NED mediante AMPK.

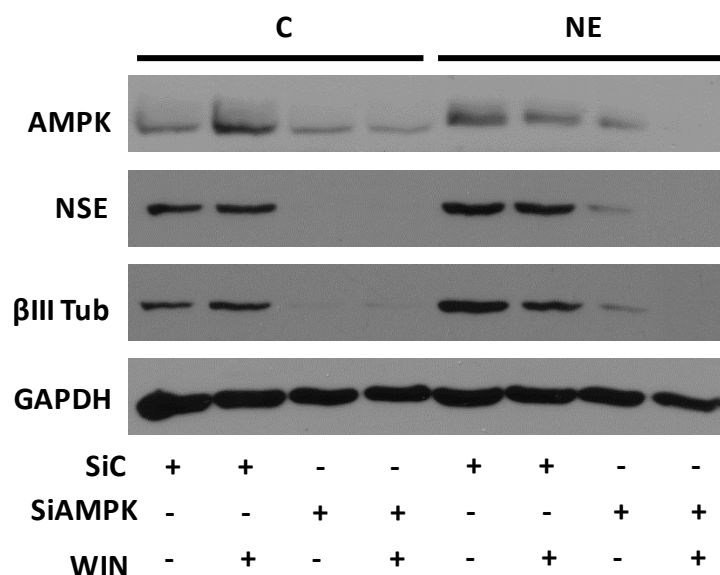


Figura 57. Efecto del silenciamiento de AMPK sobre la de WIN 55,212-2 (WIN). Las células LNCaP se sembraron, silenciaron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de AMPK, enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron transfectadas con ARN de interferencia control (siC) o con ARN de interferencia selectivo para AMPK. En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con WIN 3μM.

6.5. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la secreción de IL-6 en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado la capacidad de los cannabinoides y vanilloides de modular la secreción de IL-6 en células de cáncer de próstata (Olea-Herrero et al. 2009b; Malagarie-Cazenave et al. 2011). Con este antecedente, decidimos analizar si el cannabinoide WIN era capaz de modificar el aumento en la secreción de IL-6 observado en células NE (Figura 20). En las mismas condiciones en las que se determinaron los niveles de ARNm de IL-6 en el experimento de la figura 20, se midieron los niveles de ARNm de IL-6 cuando las células recibieron tratamiento con WIN. En la figura 58 se aprecia que el tratamiento con WIN produce una disminución en los niveles de ARNm de IL-6 en las células NE casi a niveles de las células LNCaP.

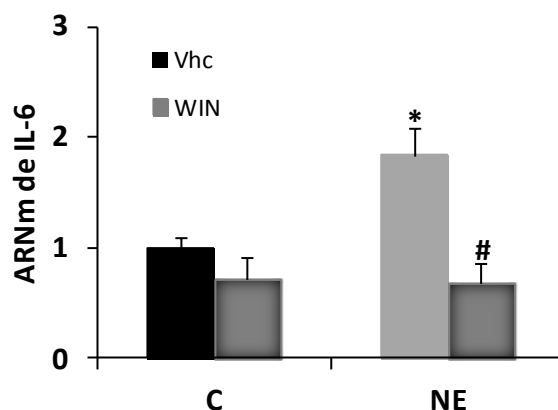


Figura 58. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre los niveles de IL-6 en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de ARNm correspondiente a IL-6 medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con WIN 3 μ M. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control; # $p < 0,05$ con respecto a NE).

Para conocer el papel de IL-6 en la diferenciación neuroendocrina se silenció su expresión (Figura 59A). El silenciamiento de IL-6 no redujo los niveles de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub en las células NE, indicando que, aunque la expresión de IL-6 aumenta en la NED, este aumento no es necesario para que se produzca la diferenciación neuroendocrina. En concordancia con este resultado, el tratamiento con WIN redujo los niveles de marcadores neuroendocrinos tanto en células NE con IL-6 silenciada como en las no silenciadas (Figura 59B).

Este resultado demuestra que el aumento de la expresión génica de IL-6 que se produce durante la NED de las células LNCaP es una consecuencia del proceso y no un factor desencadenante del mismo, ya que en condiciones de silenciamiento de IL-6 se mantienen los niveles de marcadores neuroendocrinos asociados con el proceso. Por otro lado, este resultado pone en evidencia que el efecto de WIN observado sobre los marcadores neuroendocrinos no depende del nivel de expresión de IL-6, y por tanto no está mediado por esta interleuquina.

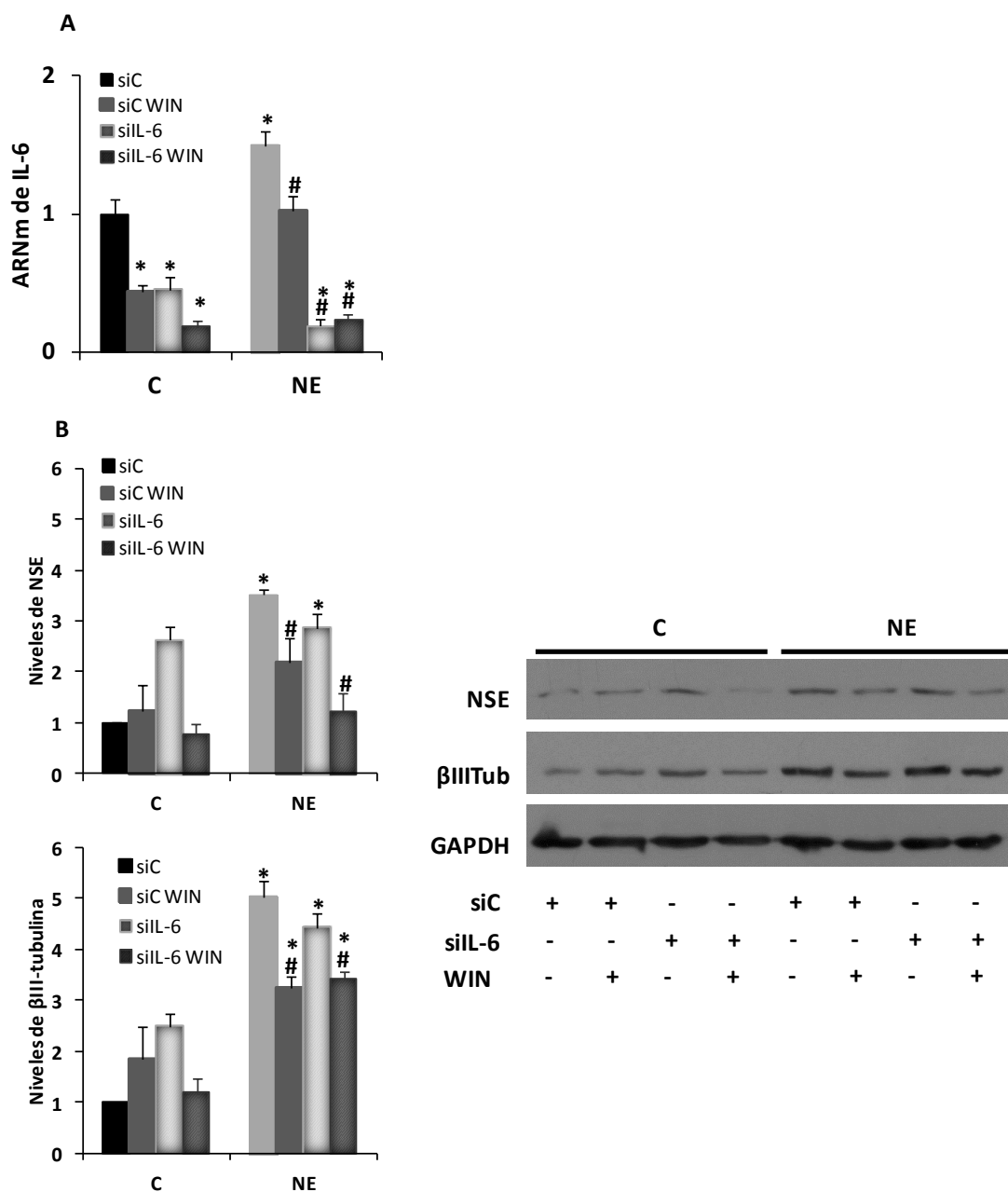


Figura 59. Silenciamiento de IL-6 en la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP. Las células LNCaP se sembraron, silenciaron y se cultivaron en presencia o en ausencia de suero tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. **A.** ARNm correspondiente a IL-6 medido mediante PCR cuantitativa a tiempo real en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE). En los casos indicados, las células fueron transfectadas con RNA de interferencia control (siC) o con RNA de interferencia selectivo para IL-6. En los casos indicados, las células fueron tratadas durante 6 días con WIN 3µM. **B.** Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en células LNCaP (control, C) y células neuroendocrinas (NE) en las mismas condiciones de A. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de dos experimentos independientes (*p<0,05 con respecto al control; #p<0,05 con respecto a NE).

6.6. Estudio del efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) en el crecimiento de tumores con presencia de células NE.

Para analizar el efecto de WIN sobre el crecimiento de tumores de cáncer de próstata con presencia de células NE se generaron tumores xenógrafos inyectando subcutáneamente una mezcla en partes iguales de células PC-3+LNCaP o PC-3+NE, respectivamente, y se realizó un tratamiento peritumoral con una dosis de 1,5 mg/Kg de WIN durante 15 días. El tratamiento con WIN fue capaz de reducir el ritmo de crecimiento de ambos tipos de tumores (Figura 60, figura 61). Con este resultado se pone evidencia que, al igual que en las condiciones *in vitro*, el cannabinoide WIN induce una disminución del crecimiento de tumores de cáncer de próstata, tanto con presencia como con ausencia de células NE.

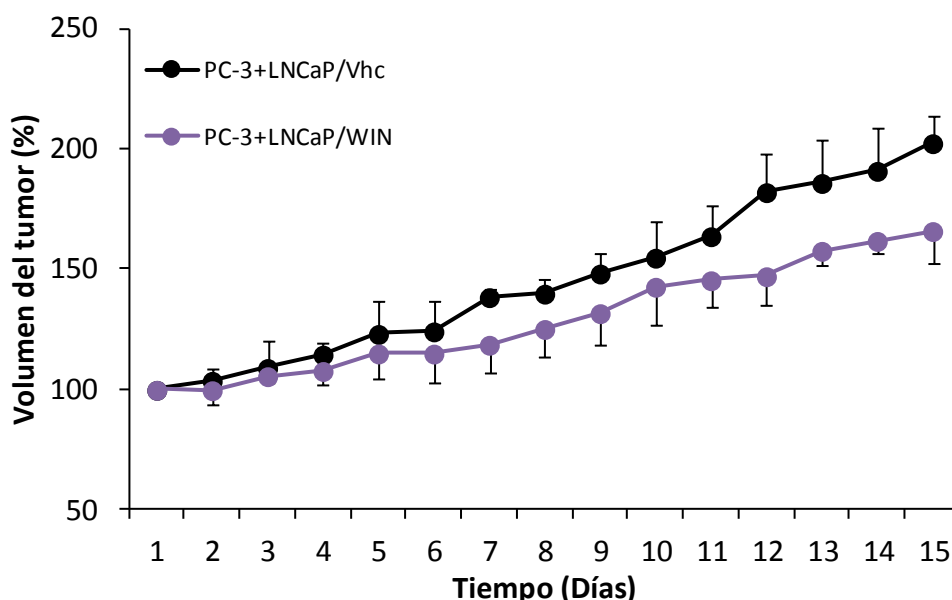


Figura 60. Efecto de WIN 55,212-2 (WIN) sobre el crecimiento de tumores mixtos de células PC-3 y LNCaP. Se inyectaron subcutáneamente ratones inmunodeprimidos con una mezcla de células PC-3+LNCaP tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Los tumores recibieron tratamiento peritumoral de 15 días de duración con vehículo (Vhc) o con 1,5mg/Kg de WIN (WIN) y se midieron diariamente. El volumen del tumor se calcula con la fórmula $0,523 \times W \times L$; siendo W el ancho del tumor y L la longitud del mismo. El día 1 se consideró el 100% del volumen y los valores están referidos a este dato. Los datos representan la media de 4 ratones \pm C.V.

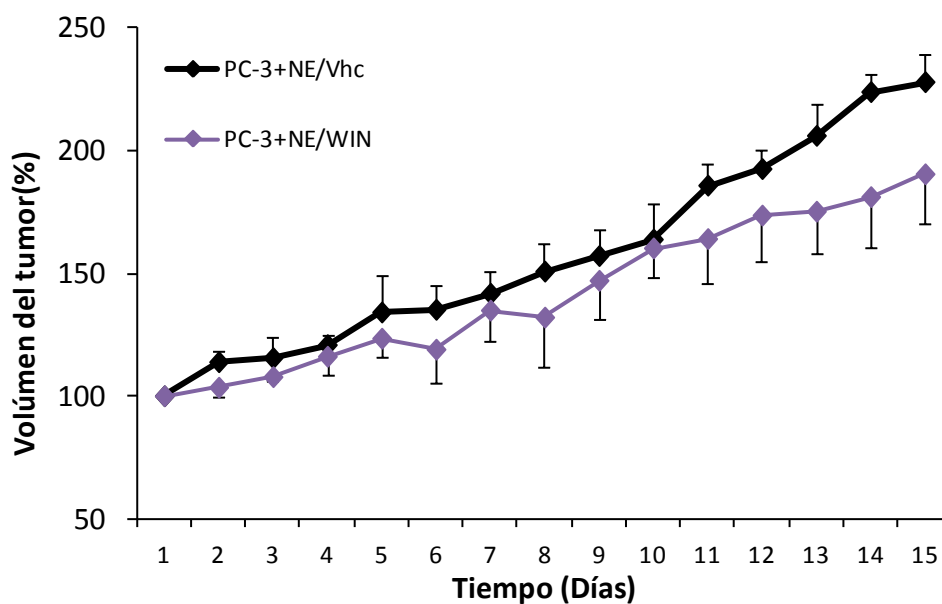


Figura 61. Efecto de WIN 55,212-2 (WIN) sobre el crecimiento de tumores mixtos de células PC-3 y células neuroendocrinas. Se inyectaron subcutáneamente ratones inmunodeprimidos con una mezcla de células PC-3+NE tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Los tumores recibieron tratamiento peritumoral de 15 días de duración con vehículo (Vhc) o con 1,5mg/Kg de WIN (WIN) y se midieron diariamente. El volumen del tumor se calcula con la fórmula $0,523 \times W \times L$; siendo W el ancho del tumor y L la longitud del mismo. El día 1 se consideró el 100% del volumen y los valores están referidos a este dato. Los datos representan la media de 4 ratones \pm C.V.

6.7. Efecto de WIN 55,212-2 (WIN) en células PC-3 utilizadas como modelo celular de diferenciación neuroendocrina.

Las células PC-3 se consideran una línea celular representativa del carcinoma prostático neuroendocrino de células pequeñas, un tipo muy agresivo y poco frecuente de cáncer de próstata (Tai et al. 2011). De hecho, las células PC-3 expresan niveles altos de marcadores neuroendocrinos como NSE y β III Tub y no expresan AR ni PSA. Más aún, las células PC-3 habitualmente conservan estas características neuroendocrinas incluso en presencia de suero. Por lo anteriormente citado, se utilizó un modelo *in vitro* de diferenciación neuroendocrina con células PC-3 cultivadas en presencia de suero durante 6 días y sobre este modelo se analizó el efecto del cannabinoide WIN.

En primera instancia, se midieron los niveles de marcadores neuroendocrinos NSE, β III Tub, AR y PSA en células PC-3, al igual que en el modelo *in vitro* con células LNCaP. Tal y como se observa en la figura 62, las células PC-3 expresan altos niveles de NSE y β III Tub, similares a las células NE. Por su parte, los niveles de AR y PSA son mucho más bajos que en las células NE. Adicionalmente, se midió el nivel de IL-6 en células PC-3, observándose que sus niveles son superiores a los de las células LNCaP y NE (Figura 63).

En segundo lugar, se estableció el efecto de WIN sobre la viabilidad de las células PC-3 *in vitro*. Como se observa en la figura 64, en rangos de dosis micro molar el cannabinoide WIN fue capaz de disminuir el número de células vivas en cultivo y el tratamiento con los agonistas inversos SR1 y SR2, solos o en combinación, no afectó al efecto de WIN. Asimismo, al igual que en las células LNCaP, se evaluó el efecto de WIN sobre la expresión de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub. Para ello se incubaron las células PC-3 durante 6 días con WIN 3 μ M y dicho tratamiento fue capaz de disminuir los niveles de ambos marcadores, aunque el efecto fue más acusado en el caso de β III Tub (Figura 65).

Para validar el efecto de WIN observado sobre la viabilidad celular *in vitro*, en tercer lugar, se realizó un estudio *in vivo*, generando tumores xenógrafos en ratones inmunodeprimidos y tratándolos peritumoralmente durante 15 días con una dosis de 0,5 mg/kg de WIN. En la figura 66A y 66B se observa que los tumores tratados con WIN crecieron más lentamente y que el tamaño del tumor al final del tratamiento fue considerablemente menor que los tumores que recibieron el tratamiento con vehículo. A su vez, el análisis del nivel de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub demostró una disminución en todos los tumores tratados con WIN.

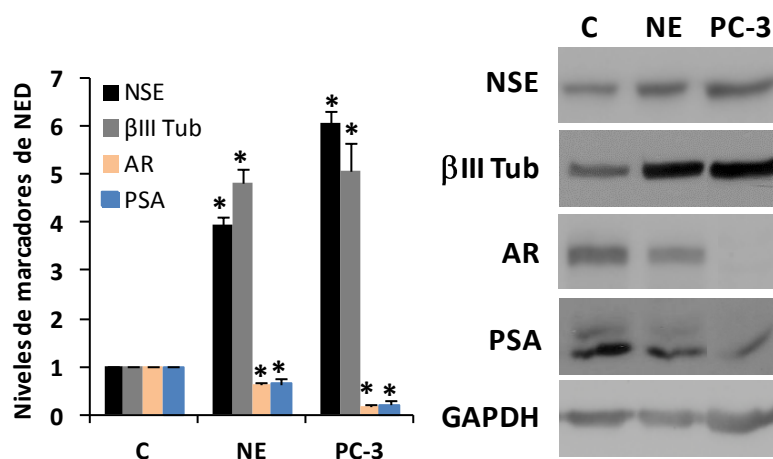


Figura 62. Niveles de marcadores neuroendocrinos en células PC-3. Las células LNCaP (control, C), las células neuroendocrinas (NE) y las células PC-3 se sembraron y se cultivaron tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), βIII-tubulina (βIII Tub), receptor de andrógenos (AR), antígeno prostático específico (PSA) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot*. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).

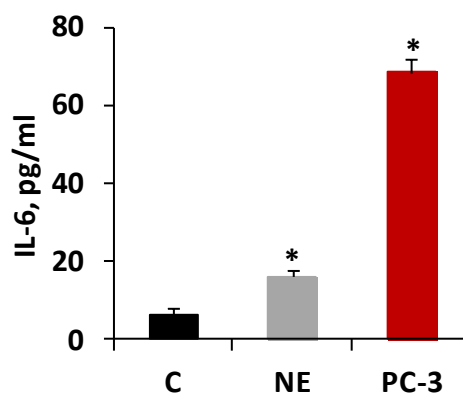


Figura 63. Niveles de IL-6 en células PC-3. Las células LNCaP, células neuroendocrinas (NE) y células PC-3 se sembraron y se cultivaron tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de IL-6 medidos mediante ensayo ELISA en sobrenadantes obtenidos de células LNCaP (control, C), células neuroendocrinas (NE) y células PC-3. Los resultados mostrados corresponden a la media ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ con respecto al control).

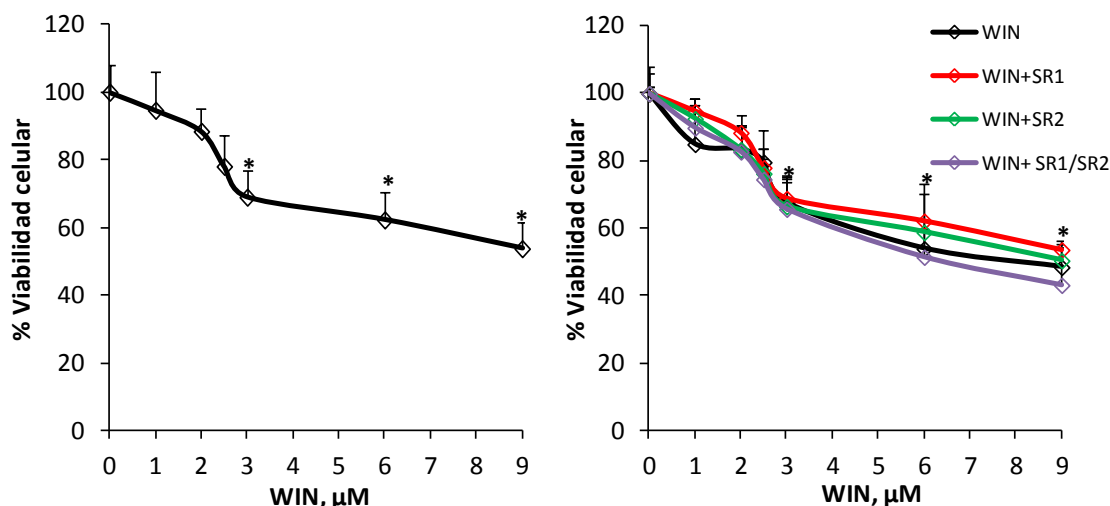


Figura 64. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la viabilidad de células PC-3. Las células PC-3 se trataron con dosis crecientes de WIN durante 48 horas y la viabilidad celular se midió mediante ensayo de MTT. En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ del agonista inverso SR141716A (SR1), SR144528 (SR2) o con la combinación de ambos. El tratamiento $0\mu\text{M}$ (solo vehículo) se consideró el 100% de células vivas y los valores obtenidos en los diferentes tratamientos fueron referidos a este dato. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por triplicado (* $p < 0,05$ con respecto al control $0\mu\text{M}$).

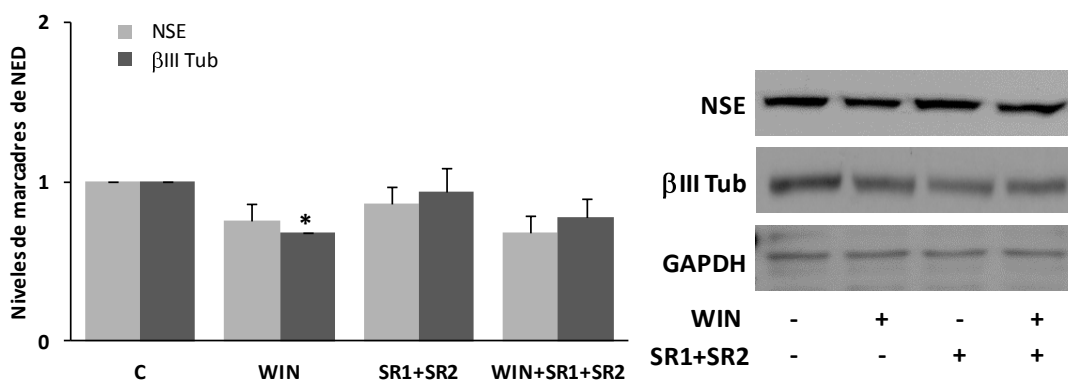


Figura 65. Efecto del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) sobre la expresión de marcadores neuroendocrinos en células PC-3. Las células PC-3 se sembraron tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot*. En los casos indicados, las células fueron pretratadas durante dos horas con $1\mu\text{M}$ de la combinación de los agonistas inversos SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2) y durante 6 días con WIN $3\mu\text{M}$. Los resultados mostrados corresponden a la media \pm D.E. de tres experimentos independientes (* $p < 0,05$ con respecto al control).

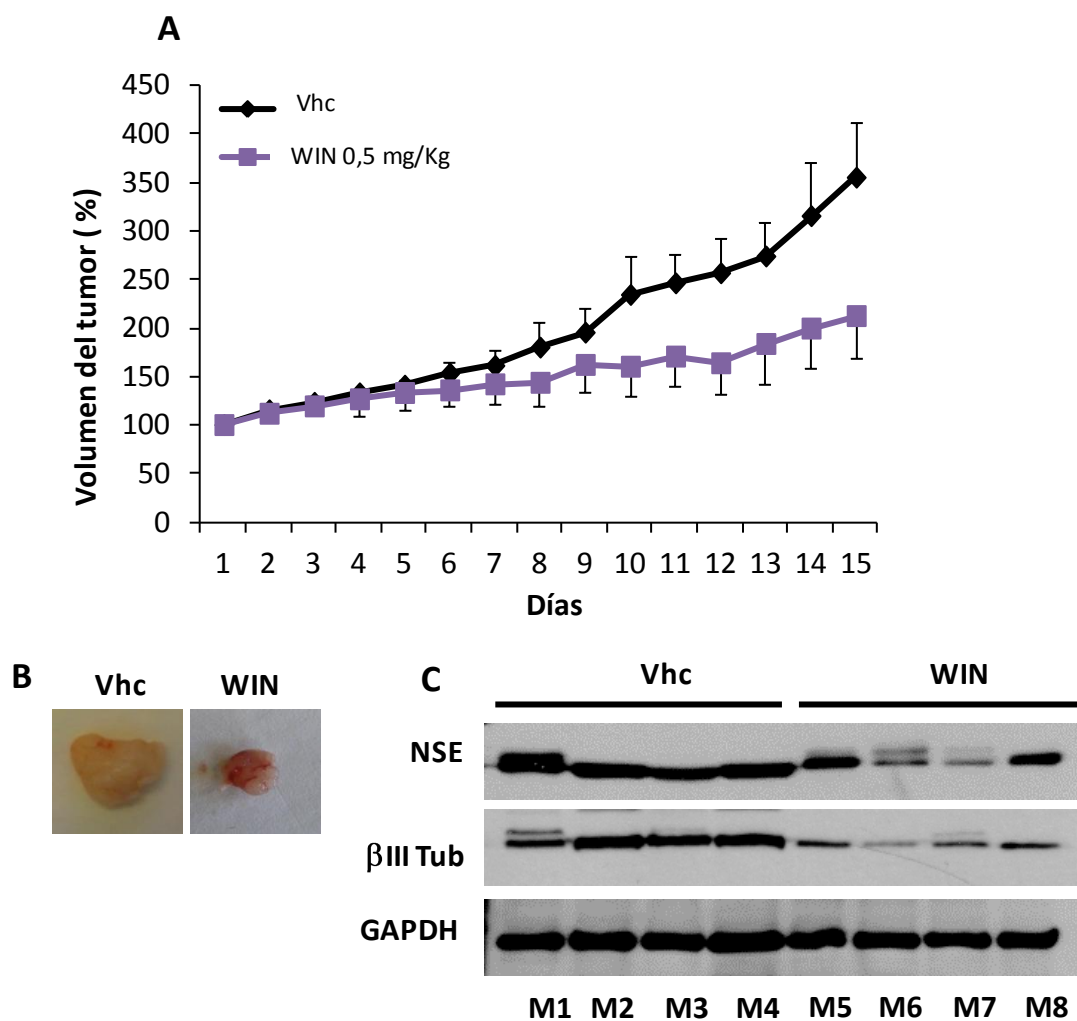


Figura 66. Efecto de WIN 55,212-2 (WIN) sobre el crecimiento de tumores de células PC-3. Se inyectaron subcutáneamente ratones atímicos con células PC-3 tal y como se describe en *Materiales y Métodos*. Los tumores recibieron tratamiento peritumoral de 15 días con vehículo (Vhc) o con 0,5mg/Kg de WIN y se midieron diariamente. **A.** Crecimiento de los tumores en función del tiempo. El día 1 se consideró el 100% del volumen y los valores están referidos a este dato. Los datos representan la media de 4 ratones por grupo \pm C.V. **B.** Fotografía representativa del tamaño de los tumores al final del tratamiento según las condiciones de A. **C.** Niveles de enolasa específica de neuronas (NSE), β III-tubulina (β III Tub) y GAPDH (utilizado como control de carga) medidos mediante *Western blot* en tumores diseccionados [M1, M2, M3, M4 ratones tratados con vehículo (Vhc); M5, M6, M7, M8 ratones tratados con WIN)].

DISCUSIÓN

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia maligna más común en la población masculina occidental y la segunda causa de muerte relacionada con cáncer, después del cáncer de pulmón (DeSantis et al. 2014; Quon et al. 2011; Ferlay et al. 2015).

A pesar de que existe terapia altamente efectiva y en la mayoría de los casos curativa para el CP localizado, las opciones terapéuticas para el CP avanzado o en fase de metástasis siguen siendo limitadas y paliativas. La terapia de eliminación de andrógenos por castración quirúrgica o química es efectiva para el tratamiento de la enfermedad avanzada con hasta un 80% de respuesta inicial, pero la progresión hacia un cáncer de próstata resistente a la castración (CPCR) ocurre muchas veces en tratamientos superiores a los 24 meses (DeSantis et al. 2014).

La terapia de eliminación de andrógenos (ADT) induce apoptosis en las células cancerígenas, pero a pesar de que la respuesta inicialmente es alta, se produce remisión debido a que hay células cancerígenas que sobreviven adquiriendo un fenotipo independiente de andrógenos. En el CP hay un aumento de la población de células neuroendocrinas (NE), fenómeno denominado diferenciación neuroendocrina (NED) y se ha propuesto que estas células juegan un papel en la progresión del CP y en la aparición de la resistencia a andrógenos. Así pues, se considera a la NED como una respuesta adaptativa a la terapia hormonal, cuyo estatus aumenta en el cáncer de próstata resistente a castración (Hirano et al. 2004; Beltran et al. 2011). Se considera, en gran parte, que la NED aumenta conforme avanza la enfermedad y que su incidencia se ve aumentada debido al uso clínico de potentes antiandrógenos (Wyatt et al. 2016).

La progresión del CPCR asociada a la NED es compleja ya que involucra una combinación de variables como selección clonal y sobreexpresión de genes antiapoptóticos y vías de crecimiento alternativas lo que supone que las células NE adquieren la capacidad de sobrevivir en ausencia de andrógenos. Es, por tanto, muy importante para la mejora del tratamiento de pacientes con CP avanzado el descubrimiento de nuevos biomarcadores que ayuden a discriminar entre estados más y menos agresivos y desarrollar tratamientos que posibiliten la intervención en los procesos celulares que subyacen a la progresión hacia el CPCR asociado a NED.

En esta tesis doctoral se han estudiado diferentes mecanismos moleculares que intervienen en la NED del cáncer de próstata con el fin de encontrar nuevas dianas de intervención terapéutica que permitan frenar este proceso.

1. Modelo celular de diferenciación neuroendocrina y crecimiento celular.

La capacidad de las células de cáncer de próstata de sufrir diferenciación neuroendocrina ha sido extensamente descrita en la bibliografía en los últimos años. Este proceso de transdiferenciación ha sido relacionado con diversas condiciones en el microambiente o con las condiciones de crecimiento en que se encuentran las células tumorales prostáticas. Está establecido que la NED de las células de CP puede surgir como consecuencia de la ADT (Shen et al. 1997; Burchardt et al. 1999; Cox et al. 1999; Wright et al. 2003), la terapia de radiación ionizante (Deng et al. 2011), la terapia con docetaxel por períodos prolongados (Hansson & Abrahamsson 2003; Hirano et al. 2004; Tang et al. 2009), el tratamiento prolongado con agentes adrenérgicos (Cox et al. 1999) y la exposición a factores que sean capaces de activar la cascada de señalización de interleuquina-6 (IL-6) (Xie et al. 2004; Vashchenko & Abrahamsson 2005; Lee et al. 2007).

Para el establecimiento de un modelo celular de diferenciación neuroendocrina de cáncer de próstata se eligió, en primer lugar la línea celular LNCaP, representativa de la fase de respuesta a los andrógenos de la enfermedad. Cuando las células LNCaP se cultivan en un medio suplementado con suero bovino fetal tratado con carbón activado desarrollan una transdiferenciación progresiva hacia un fenotipo neuroendocrino *in vitro* y la NED obtenida por esta metodología se asemeja a lo que ocurre en los pacientes tras la terapia antiandrogénica. En estas condiciones las células LNCaP exhiben características fenotípicas de células neuronales, no muestran actividad proliferativa, expresan múltiples marcadores neuroendocrinos y no expresan receptor de andrógenos (AR) ni antígeno prostático específico (PSA). Cuando las células LNCaP vuelven a cultivarse en medio con suero normal el proceso de NED se revierte (Shen et al. 1997; Cox et al. 1999).

En nuestro trabajo experimental la NED se estableció mediante el cultivo de células LNCaP en medio carente de suero bovino fetal a diferentes tiempos. Es de remarcar, por tanto, que en estas condiciones se retiran todas las hormonas y factores de crecimiento presentes en el suero. En nuestro modelo, las células LNCaP adquieren un fenotipo característicamente neuroendocrino a los 6 días de cultivo sin suero, por lo que se denominaron células neuroendocrinas (NE) al llegar a este punto. Pese a que los carcinomas prostáticos con marcadas características neuroendocrinas tienden a ser pobremente diferenciados, más agresivos y resistentes a la ADT, las células NE neoplásicas no muestran evidencia de actividad proliferativa. En nuestro modelo celular de NED, a los 6 días de retirada de suero, la densidad celular del cultivo es significativamente menor que la que se observa en células cultivadas en presencia de suero durante el mismo tiempo, comprobándose que las células NE dejan de crecer. La falta de actividad proliferativa en las células NE tiene implicaciones terapéuticas, debido a que los agentes citotóxicos y la terapia de radiación afectan predominantemente a células cancerígenas que mantienen un ciclo celular activo, por lo que la aparición de células NE supone un mecanismo de resistencia a la terapia (Bonkhoff et al. 1995; Bonkhoff 1998). Está muy bien establecido que las células NE en el CP producen una variedad de factores de crecimiento y hormonas peptídicas que

mediante mecanismos paracrinos pueden promover la proliferación de las células tumorales adyacentes en condiciones de privación de andrógenos (Abrahamsson 1999). Algunos de estos productos de secreción se consideran marcadores neuroendocrinos y sus niveles en sangre se utilizan para la monitorización de pacientes con CPRC. Entre ellos se encuentran la enolasa específica de neuronas (NSE) y β III-tubulina (β III Tub). En nuestro modelo ambos marcadores neuroendocrinos mostraron un aumento significativo a los 6 días de retirada de suero. Como se comentó en la introducción, las células NE del CP no expresan AR ni PSA y esta característica es reproducible en nuestro modelo celular de NED. En la figura 67 se resumen los cambios producidos en las células LNCaP cuando sufren NED mediante eliminación de andrógenos.

Las características fenotípicas y genotípicas hasta aquí citadas, al igual que en otras variantes de modelos *in vitro* de NED, son reversibles. Es decir, la reposición de suero al medio de cultivo permite que las células retornen a su estado morfológico inicial, que expresen niveles basales de NSE, β III Tub, AR y PSA y que recuperen su capacidad proliferativa. En nuestras condiciones experimentales ha sido posible observar la reversibilidad del proceso de NED, con el restablecimiento de las características fenotípicas, de crecimiento celular y de los niveles de marcadores NE, cuando las células NE son cultivadas nuevamente en medio suplementado con suero.

En nuestro modelo celular de NED, las células NE muestran niveles de IL-6 más elevados que los de las células LNCaP, tanto a nivel de ARNm como de proteína. En suero de pacientes con cáncer de próstata avanzado los niveles de IL-6 son elevados (Adler et al. 1999; Drachenberg et al. 1999; Shariat et al. 2001) y los niveles de IL-6 y de su receptor son más elevados en células de CP que en células normales (Giri et al. 2001). En conjunto, estos resultados evidencian que IL-6 podría utilizarse como un marcador neuroendocrino adicional a los clásicamente utilizados NSE y β III Tub, asociado con la NED de las células LNCaP.

Numerosos estudios realizados en muestras obtenidas de pacientes con cáncer de próstata que han recibido un tratamiento antiandrogénico prolongado, han demostrado un aumento en el número de células NE. De estos resultados se desprende el postulado de que la ADT induce NED de células de CP (Ito et al. 2001; Ismail A et al. 2002; Hirano et al. 2004). Para la reproducción de estos hallazgos encontrados en especímenes clínicos, se han desarrollado modelos *in vitro* e *in vivo*. Los modelos *in vitro* ofrecen diferentes estrategias para el establecimiento de NED en cultivos celulares, siendo la retirada de andrógenos del medio de cultivo la más utilizada. Esta estrategia también se ha utilizado en modelos *in vivo*, generando tumores xenógrafos en ratones castrados o tratados con agentes antiandrogénicos y en todos ellos se ha observado un claro aumento de diferentes marcadores neuroendocrinos (Jongsma et al. 1999; Jongsma et al. 2000; Burchardt et al. 1999; Kaplan-Lefko et al. 2003; Huss et al. 2004). En nuestro caso, para el estudio de los efectos de las células NE sobre el crecimiento y capacidad tumoral de células resistentes a andrógenos se realizaron dos estrategias. Por un lado, se analizó el efecto de la presencia de células NE en el cultivo de células PC-3 (co-cultivo), y por otro, la adición de sobrenadantes obtenidos de cultivos de células NE a cultivos de células PC-3. El co-cultivo de células PC-3 con células NE indujo un incremento de la viabilidad

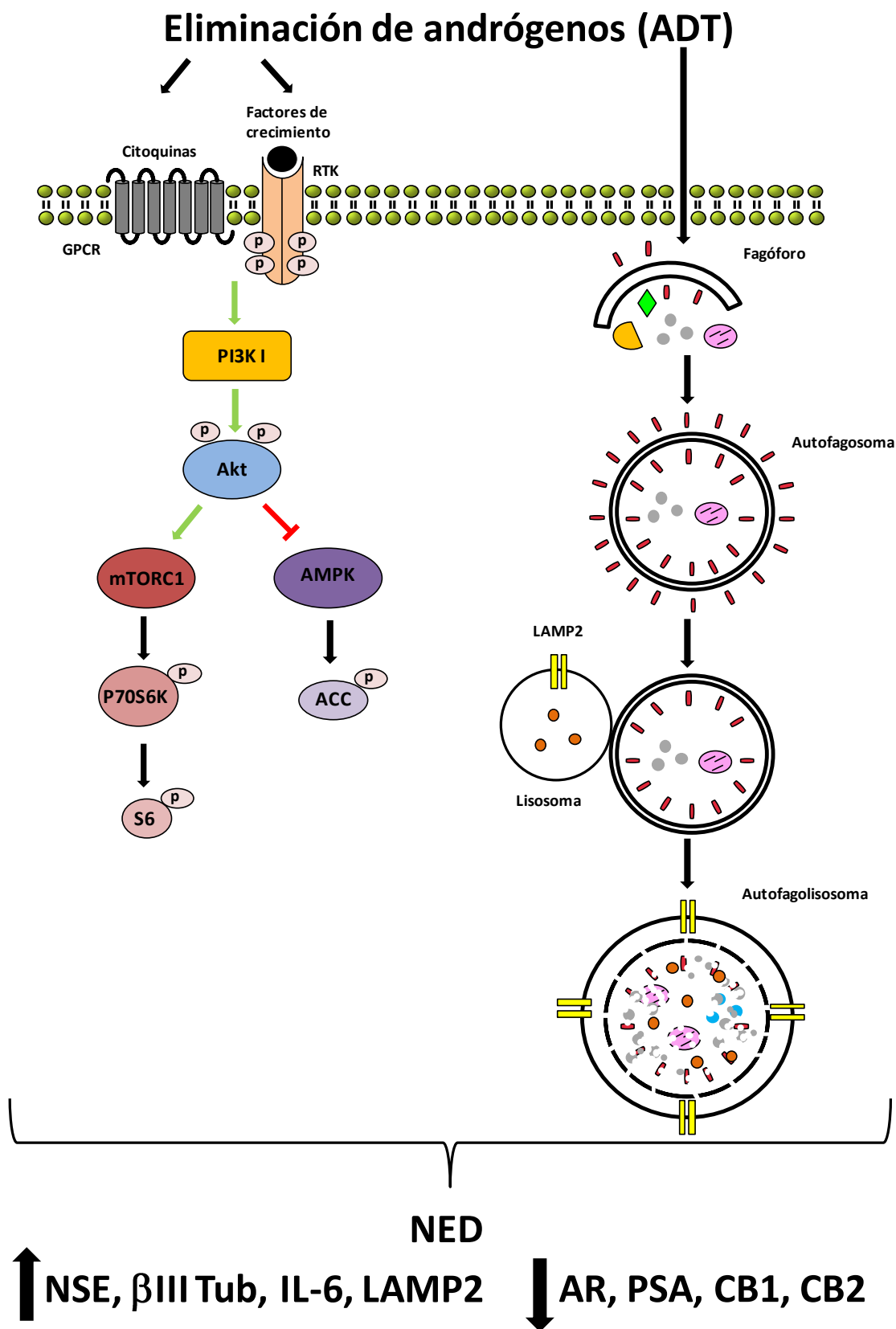


Figura 67. La diferenciación neuroendocrina (NED) de células de cáncer de próstata LNCaP obtenida mediante la eliminación de suero del medio de cultivo (ADT) induce activación de la vía PI3K/Akt/mTOR, inhibición de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) y activación de la autofagia.

celular con respecto al co-cultivo de células PC-3 con células LNCaP, lo que indica un aumento de la proliferación. Por su parte, el efecto de los sobrenadantes de células NE sobre las células PC-3 también generó un aumento en la viabilidad celular de las células PC-3. Las condiciones de co-cultivo *in vitro* fueron reproducidas en un modelo animal, y en línea con lo obtenido en los modelos celulares, se observó que la presencia de células NE en tumores de células PC-3 hace que estos crezcan más de prisa que aquellos que solo se generaron por la inyección subcutánea de células PC-3 y LNCaP. Todos estos resultados obtenidos permiten establecer que nuestro modelo celular de NED de células LNCaP por retirada de suero, es un modelo experimental que sirve para demostrar la capacidad proliferativa y tumoral *in vitro* e *in vivo*, de las células NE.

En otro modelo de diferenciación neuroendocrina, utilizando células PC-3 cultivadas en presencia de suero durante 6 días, también se demostraron las características de este fenómeno. Los resultados obtenidos demuestran que las células PC-3, representativas de las etapas más avanzadas y agresivas de la enfermedad, también exhiben niveles altos de marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub y niveles bajos AR y PSA, más aún que los que exhiben las células NE. Estas células también expresan IL-6, en niveles muy por encima que los observados en las células NE. Así, por lo tanto, las células PC-3 también son un buen modelo experimental para el estudio de la NED en el CP.

2. Estudio de la señalización celular en la diferenciación neuroendocrina de las células de cáncer de próstata LNCaP.

2.1. Papel de la vía de señalización PI3K/Akt.

La vía de señalización PI3K/Akt posee la función de regular el crecimiento y proliferación celular, entre otras. En numerosos cánceres esta vía sufre una desregulación debido a mutaciones, amplificación o delección génica, metilación o modificaciones postranscripcionales; siendo de gran importancia en la regulación de la transformación, apoptosis, progresión y metástasis tumoral (Murillo et al. 2001; Ni et al. 2013; Edlind & Hsieh 2014; Fruman & Rommel 2014; Thorpe et al. 2015). En las células tumorales prostáticas, el eje PI3K/Akt/mTOR está sobre activado, generalmente por mutación en PTEN. Además, esta vía ha sido implicada en la carcinogénesis del cáncer de próstata debido a múltiples interconexiones entre PI3K y el receptor de andrógenos (AR). Se ha demostrado que durante la terapia de eliminación de andrógenos la inhibición de la vía de señalización activada por el AR es uno de los estímulos capaces de inducir activación de la vía PI3K/Akt. En concordancia con este dato, recientemente se ha demostrado que el AR regula negativamente a PI3K I mediante inhibición de la subunidad reguladora p85 α (Edlind & Hsieh 2014; Munkley et al. 2015). Los resultados obtenidos en este trabajo están en línea con estas evidencias, ya que en nuestro modelo celular de NED se observa un aumento en la fosforilación de Akt en la serina 473 y en su diana, S6, conjuntamente con el aumento de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub. Resultados similares a los nuestros publicados por Qi y colaboradores indican que la retirada de andrógenos incrementa

los niveles de fosforilación de Akt en la serina 473 y treonina 308 en células LNCaP (Qi et al. 2015). La importancia de la vía PI3K/Akt en la NED de las células LNCaP ha sido demostrada previamente por otros grupos de investigación utilizando otros estímulos ,además de la retirada de andrógenos, como el tratamiento prolongado con IL-6 o la utilización de agentes que elevan los niveles de AMPc intracelular (Murillo et al. 2001; Gutiérrez-Cañas et al. 2005; Martín-Orozco et al. 2007; Cortés et al. 2012; Zhu et al. 2014). Todos estos resultados, al igual que los obtenidos en esta tesis doctoral, indican que la activación de la cascada PI3K/Akt es un mecanismo general asociado con la NED de las células de cáncer de próstata, al menos *in vitro*. Por su parte, la utilización de inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR pone en evidencia que, al igual que en otros trabajos, la actividad de la vía es fundamental para el desarrollo de la NED en células de cáncer de próstata LNCaP ya que su inhibición impide el desarrollo de este fenómeno (Figura 68).

2.2. Papel de la quinasa dependiente de AMP.

La vía de señalización de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) fue originalmente caracterizada dentro de una cascada de señalización inhibitoria de tumores, aunque en realidad AMPK juega un papel bastante más complejo y no es posible simplemente definirla como oncogénica o antioncogénica (Zadra et al. 2015; Kim 2015).

El papel de AMPK en cáncer está siendo desvelado mediante la aplicación de aproximaciones experimentales complementarias, tales como el silenciamiento génico, regulación farmacológica de su actividad o empleo de mutantes en diferentes modelos experimentales. Faubert y colaboradores han descrito que AMPK regula negativamente el efecto Warburg y además, la mutación del gen de AMPK α 1, única subunidad expresada en linfocitos B, acelera el desarrollo de linfomas en ratones transgénicos que sobreexpresan c-Myc, sugiriendo que la pérdida de AMPK podría cooperar con la tumorigénesis de manera específica de tejido (Faubert et al. 2013). Por otra parte, AMPK ejerce un efecto supresor de tumores mediante la inhibición del complejo mTORC1 y de la síntesis de ácidos grasos, requeridas para la progresión del ciclo celular y la síntesis de membranas, respectivamente (Gwinn et al. 2008; Shackelford & Shaw 2009; Scaglia et al. 2014). Otro mecanismo, a favor del comportamiento de AMPK como supresor de tumores, ha sido descrito por Shen y colaboradores, demostrando que la fosforilación dependiente de AMPK del oncogen BRAF conduce a la supresión de la cascada MEK-ERK y la consecuente interrupción del efecto de la misma sobre la proliferación y progresión del ciclo celular (Shen et al. 2013). Se ha observado también, que el eje LKB1/ AMPK está inhibido en células de melanoma lo que favorecería la actividad del oncogén BRAF^{V600E} involucrado en la tumorigénesis. En cáncer de mama y próstata se ha descrito que AMPK actúa como supresor de tumores bloqueando el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima, proceso relacionado con la invasión y metástasis tumoral (Chou et al. 2014). Por otro lado, en tumores de riñón deficientes de fumarato-hidratasa los niveles de AMPK están disminuidos (Tong et al. 2011); en tumores de cáncer de mamá el aumento de expresión de citocromo P450-1A1, el mayoritario en este tipo de cáncer, se produce en

parte por la disminución de AMPK (Rodríguez & Potter 2013); y en algunos tipos de carcinoma hepatocelular se observa una expresión reducida de AMPK α 2 que hace a las células más tumorigénicas (Lee et al. 2012). Toda esta información, analizada en conjunto, pone en evidencia que AMPK ejerce un papel supresor de tumores en el marco de un contexto genético, metabólico y de señalización celular específico.

Poco se sabe acerca de la expresión y la actividad de AMPK en CP, y los resultados obtenidos en relación a estas cuestiones son contradictorios. Zadra y colaboradores demostraron que el aumento en la síntesis *de novo* de lípidos en el CP está asociada con una disminución de la actividad de AMPK y la activación farmacológica de AMPK bloquea la lipogénesis e inhibe el crecimiento de células de CP *in vitro* e *in vivo* (Zadra et al. 2010). En otro sentido, los hallazgos de Park y colaboradores demostraron que en un 40% de las muestras clínicas de CP que analizaron hay una elevación de la fosforilación de ACC, medida indirecta de la actividad elevada de AMPK (Park et al. 2009). El estudio realizado por Frigo y colaboradores demostró que los andrógenos aumentan la expresión y funcionalidad de CaMKK β en células de CP lo que desencadena un aumento en la actividad de AMPK; el bloqueo del eje CaMKK β /AMPK produce inhibición de la migración e invasión mediada por el AR (Frigo et al. 2011). Este mismo grupo de investigación amplió estos estudios y, mediante una aproximación metabólica, demostró que el tratamiento con andrógenos aumenta la tasa de oxidación de glucosa, de ácidos grasos y con ello el crecimiento celular mediante un mecanismo dependiente de AMPK y del coactivador 1 α de PPAR γ (PGC-1 α) (Tennakoon et al. 2015). En concordancia con los resultados de Frigo y colaboradores el estudio genómico realizado por Massie y colaboradores ha demostrado que CaMKK β juega un papel regulador esencial en los procesos anabólicos y de crecimiento tumoral, desencadenados por el AR (Massie et al. 2011).

Nuestros resultados son los primeros datos en relación con el estado de AMPK en la NED de las células LNCaP. La actividad de AMPK está disminuida en las células NE, y esto se refleja en los bajos niveles de fosforilación de ACC (Morell et al. 2016a). Previamente a nuestro trabajo, se ha documentado que el tratamiento con metformina, fármaco utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo II, induce una activación de AMPK en tumores neuroendocrinos del sistema gastro-enteropancreático, observándose, que la supervivencia de los pacientes tratados con metformina es dos veces superior a la observada en los grupos controles (Vlotides et al. 2014; Burney et al. 2014). En línea con estos resultados, nuestros hallazgos muestran que la inhibición de AMPK se revierte con el tratamiento con AICAR, un activador farmacológico sintético de AMPK. La activación de AMPK con AICAR impide la NED de las células LNCaP (Morell et al. 2016a) (Figura 68).

La inhibición de AMPK observada en nuestro modelo celular de NED es dependiente de la activación de Akt, ya que la inhibición farmacológica de la vía PI3K/Akt/mTOR induce una activación de AMPK y esto impide la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP. Este resultado está en concordancia con los datos publicados por Horman y colaboradores, que demostraron que la proteína Akt fosforila AMPK en serina 485, reduciendo su activación mediante LKB1, lo cual tiene una importante connotación en tumores en los cuales se da hiperactivación de Akt por mutaciones con pérdida de función de PTEN o mutaciones activadoras de PI3K como es el caso del cáncer de próstata (Horman et al. 2006). Por otro lado, los resultados

obtenidos recientemente por Lin y colaboradores demostraron que la activación de Akt en basófilos podría inhibir rápidamente la activación de AMPK a través de la fosforilación inhibitoria a nivel de serina 485/491 y estar acompañado de una reducción de la fosforilación de ACC (Lin et al. 2016). Adicionalmente, Kim y colaboradores han observado en neuronas corticales que el tratamiento crónico con insulina activa Akt que a su vez ejerce una fosforilación inhibitoria sobre AMPK (Kim et al. 2015). Pese a que en nuestro trabajo no hemos medido los niveles de fosforilación de AMPK en serina 485/491, nuestros resultados muestran que la inhibición de la vía PI3K/Akt, impide la inhibición de AMPK en las células NE, proveyendo una conexión entre la señalización mediada por Akt y AMPK durante la NED de las células LNCaP.

3. Estudio de la autofagia en la diferenciación neuroendocrina de células de cáncer de próstata LNCaP.

El papel que la autofagia tiene en el cáncer es complejo, ya que se sabe que desempeña funciones tanto en la prevención del desarrollo de la enfermedad como en el desarrollo de la resistencia al tratamiento. Las vías que regulan la autofagia se superponen estrechamente con las que regulan la tumorigénesis. Varios oncogenes comúnmente activados durante el proceso tumoral, como por ejemplo aquellos que codifican a PI3K de clase I, Akt, mTOR y Bcl-2, inhiben el proceso autofágico. Por otro lado, varios genes supresores de tumores que estimulan el proceso autofágico, se encuentran mutados o silenciados epigenéticamente, como por ejemplo aquellos que codifican a PTEN, quinasas DAP y TSC1/TSC2 (Botti et al. 2006; Todde et al. 2009; Galluzzi et al. 2015).

El cáncer fue una de las primeras enfermedades en la que se estableció una relación entre defectos genéticos y alteración de la función autofágica (Mizushima et al. 2008). Por ejemplo, el gen de la proteína beclina-1 sufre una delección monoalélica en un 40-75% de los cánceres de mamá, ovario y próstata (Liang et al. 1999). Este hecho, probablemente, es importante desde el punto de vista del proceso de tumorigénesis, debido a que se ha observado que los ratones con interrupción heterocigota de beclina-1 tienen disminuida la actividad autofágica y son capaces de desarrollar tumores espontáneamente (Qu et al. 2003; Yue et al. 2003). Evidencia adicional con respecto a la conexión entre defectos genéticos en la ejecución o regulación de la autofagia y el cáncer se ha obtenido en diversos estudios en los que se sugiere que la autofagia podría actuar como un mecanismo supresor de tumores (Mathew et al. 2007; Takahashi et al. 2007; Mariño et al. 2007). Sin embargo los mecanismos a través de los cuales esta función supresora de tumores es llevada a cabo están aún por ser determinados.

Las células de cáncer de próstata son capaces de escapar a los efectos de la terapia antiandrogénica, mediante varios mecanismos. En los últimos años se ha propuesto que la autofagia podría suponer una vía adicional de supervivencia para evadir el efecto de la retirada de andrógenos durante la ADT (Ziparo et al. 2013; Farrow et al. 2015). El receptor de andrógenos es un mediador clave en la regulación de la autofagia y se ha demostrado que su inhibición induce autofagia en células de CP.

Así, la inhibición del AR con enzalutamida produce un flujo autofágico significativo en modelos de cáncer de próstata *in vitro* e *in vivo* (Nguyen et al. 2014). Esta información, en conjunto, sugiere que la ADT y, más aún, la inhibición del AR pueden directamente promover procesos de autofagia que contribuyen a establecer un mecanismo de resistencia a la ADT en CP. Dalby y colaboradores han demostrado en células epiteliales de CP que la autofagia podría ser un mecanismo a través del cual estas células cancerígenas contrarrestan el estrés del microambiente tumoral y por lo tanto este proceso representaría un mecanismo promotor de tumores en cáncer de próstata (Dalby et al. 2010).

Se ha demostrado que el bloqueo de la autofagia sensibiliza a las células de cáncer de próstata a la acción de inhibidores de la quinasa Src (Kung 2011). El complejo de la quinasa Src fosforila al AR, resultando en su translocación al núcleo y activación independiente de andrógenos (Guo et al. 2006), con lo cual este complejo tiene un importante papel en el desarrollo de la resistencia a la ADT. Si bien los inhibidores de la quinasa Src son capaces de bloquear el crecimiento independiente de andrógenos en células de cáncer de próstata, no inducen apoptosis significativa; sin embargo el bloqueo de autofagia junto con el tratamiento con inhibidores de la quinasa Src potencia significativamente el efecto apoptótico de estos últimos (Wu et al. 2010). Nuestro grupo de investigación ha demostrado que la capsaicina, el componente picante de los pimientos rojos, es capaz de inducir muerte de células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 mediante el bloqueo de la autofagia (Ramos-Torres et al. 2016). La inhibición de la autofagia puede resultar una estrategia terapéutica para contrarrestar la resistencia a la quimioterapia y radioterapia del cáncer de próstata (Kumano et al. 2012; Yu et al. 2012; Bristol et al. 2013; Lamoureux et al. 2013; Lamoureux & Zoubeidi 2013). Sin embargo, en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos, se ha visto que la inducción de autofagia hace más sensibles a las células a los estímulos apoptóticos (Chen et al. 2012; Tai et al. 2012) y a la radiación (He et al. 2012).

Los resultados de nuestro trabajo experimental han permitido establecer que durante la NED de las células LNCaP se activa la autofagia. En nuestras condiciones experimentales, similares en parte a las que se establecen durante la ADT, se observa un incremento significativo de la expresión de las proteínas LC3 y Atg5 en células NE. Estos hallazgos se acompañaron de un aumento del flujo autofágico asociado con una disminución de los niveles de proteína p62 (Morell et al. 2016b). La inhibición de la autofagia en nuestro modelo de NED mostró diferentes efectos. Por un lado, el tratamiento durante 6 días con el inhibidor bafilomicina A1 no impidió el aumento de los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub. Sin embargo el silenciamiento génico de Atg5 disminuyó el nivel de ambos marcadores neuroendocrinos. Más aún, la utilización del inhibidor de autofagia 3-MA y de los inhibidores de la vía PI3K/Akt/mTOR, LY294002 y Akt inh IV, fueron capaces de impedir la NED de las células LNCaP mediante un bloqueo del flujo autofágico. El tratamiento con rapamicina, por su parte, impidió el aumento de los marcadores neuroendocrinos, aunque no mostró efecto sobre la autofagia. Este efecto limitado de rapamicina ha sido descrito por Balakumaran y colaboradores y podría deberse, entre otros factores, a que las células de cáncer de próstata sobreexpresan el gen MYC, cuyo efecto final conduce a una pérdida de sensibilidad a la rapamicina que se traduce en menor

capacidad para inhibir mTOR (Balakumaran et al. 2009). Por otro lado, la activación de AMPK con AICAR produjo un bloqueo de la autofagia en las células NE y una disminución del marcador neuroendocrino β III Tub. En la figura 68 se recogen el efecto de la inhibición de la autofagia y de las vías PI3K/Akt/mTOR y AMPK sobre la NED de las células LNCaP. La importancia de la vía PI3K/Akt/mTOR y de AMPK en la regulación de la autofagia está bien establecida. Kim y colaboradores han demostrado que estas dos vías de señalización convergen en el complejo ULK1, quinasa iniciadora de la autofagia (Kim et al. 2011b). Durante períodos de carencia de nutrientes se produce una inhibición de mTORC1 y una activación de AMPK que permiten que la autofagia se active. Sorprendentemente, en nuestras condiciones experimentales, observamos que la autofagia es un proceso activo en las células NE junto con la activación de la vía PI3K/Akt/mTOR y la actividad reducida AMPK. Esta aparente contradicción se puede explicar teniendo en cuenta que la regulación de la autofagia a través de estas vías de señalización es dinámica y especialmente importante en tratamientos prolongados (Dunlop & Tee 2014). En presencia de niveles adecuados de nutrientes, mTORC1 inhibe a ULK1 mediante dos mecanismos: fosforilando la ser 757, lo que impide su interacción con AMPK, e inhibiendo la ubiquitinación en la lys 63 lo que impide que se autofosfore y autoactive. Sin embargo, un nivel basal mínimo de autofagia persiste para permitir a la célula catabolizar orgánulos dañados, proteínas mal plegadas o agregados moleculares. Por otro lado, cuando los nutrientes y los niveles energéticos celulares descienden, AMPK inhibe el complejo mTORC1 y, mediante fosforilación, activa ULK1. A su vez, ULK1 puede fosforilar e inhibir a AMPK, lo que asegura que la ruta de autofagia no esté constitutivamente activa, lo que iría en detrimento de la célula. Sería interesante evaluar el estado de fosforilación de ULK1 en las células NE para saber si la actividad residual de AMPK es suficiente para activar ULK1 y la autofagia en las células NE. Por otro lado, en situaciones de carencia prolongada de nutrientes se requiere de la reactivación de mTOR para la degradación de los autolisosomas y el reciclado de componentes celulares (Yu et al. 2010). De hecho, en las células NE de nuestro modelo experimental, la ausencia de suero durante 6 días no produce una disminución significativa de la actividad mTOR, puesto que Akt y S6 tienen niveles de actividad elevados.

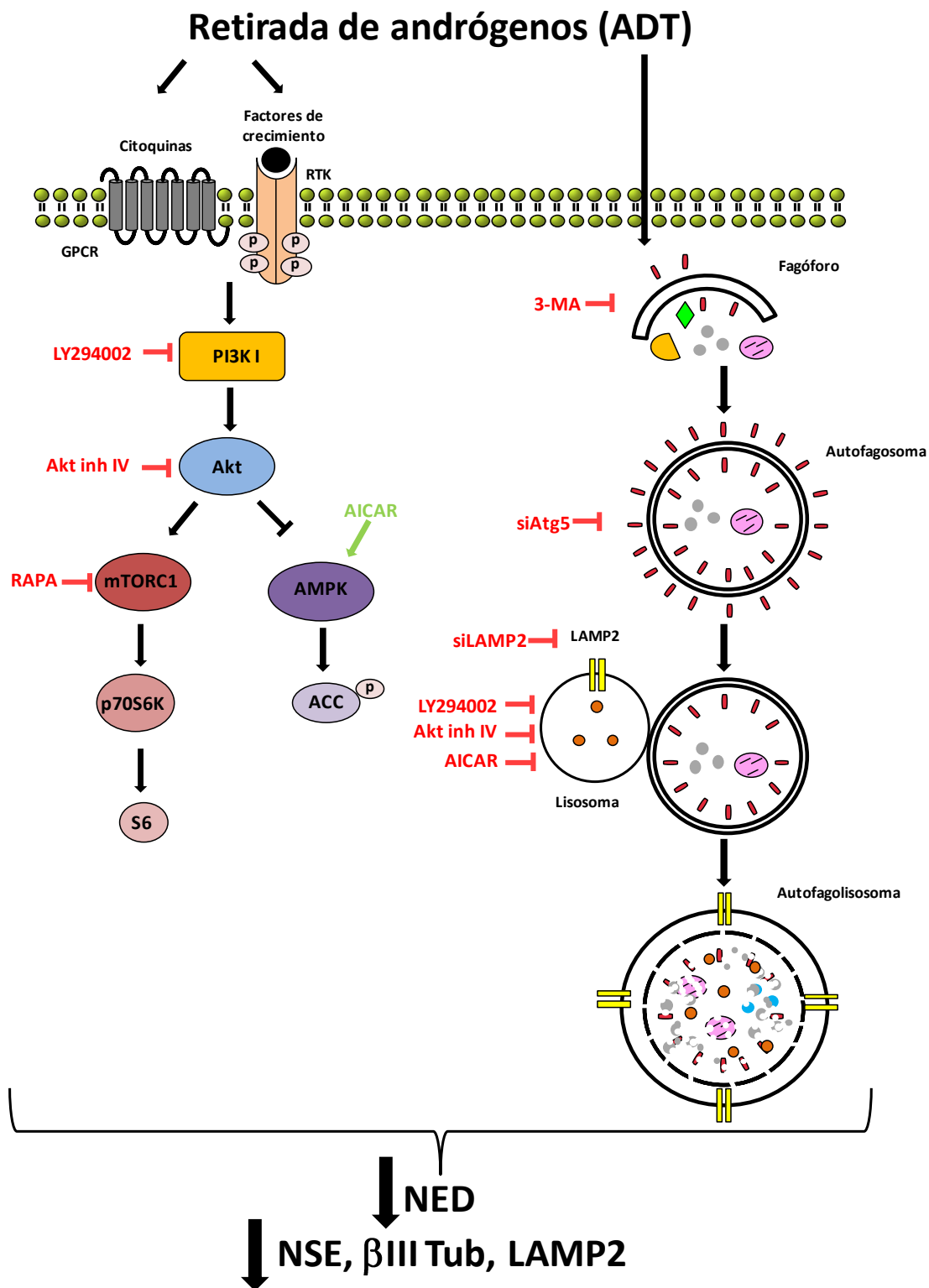


Figura 68. La inhibición de la vía PI3K/Akt/mTOR y la activación de la quinasa dependiente de AMP (AMPK) producen un bloqueo de la autofagia e impiden la diferenciación neuroendocrina (NED) de las células de cáncer de próstata LNCaP. La inhibición de la autofagia y el silenciamiento génico de LAMP2 impiden la NED de las células LNCaP.

Otro aspecto importante en la regulación de la autofagia por la ruta de señalización de PI3K/Akt/mTOR es la localización subcelular de Akt, la cual viene determinada por el contenido en PIP₃ y PIP de la membrana plasmática y del autofagosoma/lisosoma, respectivamente. En respuesta a factores de crecimiento, la PI3K I produce PIP₃ en la membrana plasmática, lo que produce la translocación y activación de Akt e inhibición de la autofagia. Por el contrario, si es PI3K III la que se activa, se produce un aumento de PIP en la membrana del autofagosoma/lisosoma que conduce a la translocación de Akt al lisosoma donde activa la autofagia (Matsuda-Lennikov et al. 2014). Sería interesante determinar la localización subcelular de Akt en las células NE, porque permitiría explicar la activación simultánea de la vía PI3K/Akt/mTOR y de la autofagia.

Nuestros resultados muestran que durante la NED de las células LNCaP se produce un aumento en la expresión de la proteína LAMP2. Para evidenciar el papel de esta proteína se silenció su expresión génica y se observó que se producía una disminución de los niveles de marcadores neuroendocrinos y un bloqueo de la autofagia. Por lo tanto, consideramos que LAMP2 podría utilizarse como un marcador neuroendocrino adicional a los clásicamente utilizados NSE y β III Tub, asociado con la NED de las células LNCaP (Morell et al. 2016b).

LAMP2 juega un papel crítico en el proceso de fusión entre el autofagosoma y el lisosoma. En células que tienen disminuida la expresión de LAMP2, o en ratones en los que se elimina la expresión de LAMP2 se observa la acumulación de vesículas autofágicas (Tanaka et al. 2000). En tumores de mama, la sobreexpresión de LAMP2 conduce a la activación de CMA y esto lleva a un aumento de la supervivencia celular (Saha 2012). Kon y colaboradores han demostrado que la sobreexpresión de LAMP2A y la activación de la CMA se produce en 40 tipos diferentes de cánceres humanos en comparación con tejidos normales, y que el bloqueo de la CMA induce una reducción de la capacidad metastásica de las células de cáncer de pulmón (Kon et al. 2011).

Los datos obtenidos en esta tesis doctoral en relación con LAMP2 son los primeros que ponen en evidencia que esta proteína podría jugar un papel importante en el desarrollo de la NED en células LNCaP. Una de las posibles funciones que LAMP2 podría desempeñar en las células NE sería la de favorecer la actividad autofágica observada en estas células. En este sentido cabe destacar que las células han desarrollado un sensor de nutrientes localizado en el lisosoma. Este sensor, constituido por el complejo proteico LAMTOR (*late endosomal/lysosomal adaptor, MAPK and mTOR activator*), las proteínas G lisosomales Rag y la bomba de H⁺ V-ATPasa, puede interactuar tanto con el complejo mTORC1 como con AMPK en función del contenido celular de nutrientes. Este complejo lisosomal conecta la autofagia con la señalización de mTORC1 o AMPK y con el estatus nutricional de la célula (Zhang et al. 2014). Sería muy interesante estudiar el papel de este sensor de nutrientes en nuestro modelo de NED y su relación con la expresión de LAMP2 en las células NE. Por otra parte, LAMP2 podría ser un intermediario clave en la adaptación a la acidosis tumoral y en este sentido Damaghi y colaboradores lo proponen como una interesante y novedosa diana terapéutica (Damaghi et al. 2015). Es de destacar que en ratones TRAMP, un modelo animal de cáncer de próstata que desarrolla NED, la administración sistemática de bicarbonato de sodio inhibe la carcinogénesis. Ante esta evidencia, creemos que sería interesante analizar los niveles de LAMP2 en tumores de cáncer de

próstata con características neuroendocrinas para establecer su posible papel en la progresión tumoral. Así, el trabajo futuro será evaluar el nivel de LAMP2 en los tumores obtenidos en nuestro modelo *in vivo* con células PC-3 y con células PC-3 y LNCaP.

En conjunto nuestros resultados ponen evidencia que la autofagia es un proceso que se activa como consecuencia de la retirada de suero del medio de cultivo, en el que están implicadas tanto la vía PI3K/Akt/mTOR como la vía de AMPK y la expresión aumentada de LAMP2.

4. Niveles de receptores de cannabinoides CB1 y CB2 y papel de WIN 55,212-2 (WIN) en la diferenciación neuroendocrina de células LNCaP.

4.1. Receptores CB1 y CB2.

El crecimiento celular descontrolado y su consecuente efecto sobre el funcionamiento normal del ciclo celular y la maquinaria apoptótica son los responsables del desarrollo de la mayoría de los cánceres, entre ellos el cáncer de próstata. Así, por lo tanto, los fármacos que sean capaces de modular la apoptosis en función de las distintas etapas en las que se encuentra la célula cancerígena son los que más éxito tendrán en el manejo de la terapia aplicada en esta enfermedad. En relación con este concepto, hay una gran necesidad de descubrir nuevos agentes que promuevan la apoptosis, ya que en el CP se observa una gran resistencia a este proceso. Dentro del área de investigación con cannabinoides, los hallazgos son sumamente interesantes y prometedores en varios tipos de cánceres, incluidos el CP.

Hasta el inicio de esta tesis doctoral no existía evidencia publicada en la bibliografía científica del nivel de los receptores CB1 y CB2 en el cáncer de próstata neuroendocrino, y hay escasa evidencia del efecto de los cannabinoides sobre la NED de células LNCaP (De Petrocellis et al. 2013). La mayoría de los componentes del sistema endocannabinoide se expresan en la glándula prostática, cumpliendo en este órgano diversas funciones fisiológicas (Sánchez et al. 2003; Chung et al. 2009; Tokanovic et al. 2007; Czifra et al. 2009; Gratzke et al. 2010). Se sabe que durante el desarrollo del CP se produce una sobreexpresión de varios componentes del sistema endocannabinoide, incluidos los receptores CB1 y CB2, lo que sugiere que el mismo tiene un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis del tejido prostático normal y su desregulación está correlacionada con el grado de malignidad y la progresión de la enfermedad. Sin embargo, nuestros resultados muestran una disminución acusada de los receptores CB1 y CB2 en la NED de las células LNCaP (Morell et al. 2016a). Las células NE son células que se transforman y adquieren características morfológicas y metabólicas diferentes de las células cancerígenas prostáticas, mostrando características de tejido neuronal. Se ha observado que durante la diferenciación de las neuronas, se produce un cambio en el patrón de expresión de los receptores CB1 y CB2 (Galve-Roperh et al. 2013). Por lo tanto, el

intenso cambio en el nivel de ambos receptores en células NE, no es un hecho que sorprenda, si se tiene en cuenta el carácter neuronal de estas células. Así pues, consideramos que este cambio en los niveles de receptores CB1 y CB2 es una muestra más del proceso de diferenciación neuroendocrina, y la disminución demostrada de ambos receptores en este trabajo podría utilizarse como marcador neuroendocrino al igual que NSE y β III Tub.

Los endocannabinoides a través de la estimulación del receptor CB1 y algunos híbridos sintéticos cannabinoides-vanilloides a través de la estimulación del receptor TRPV1, han demostrado capacidad de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en células PC-3 (Melck et al. 2000; Sánchez et al. 2003; Mimeault et al. 2003; Fowler et al. 2010). Sin embargo, THC es capaz de producir apoptosis de estas células en un mecanismo independiente de receptor (Ruiz et al. 1999). Por su parte, el receptor CB2 media el efecto apoptótico de varios cannabinoides en células de carcinoma prostático (Sarfaraz et al. 2006; Olea-Herrero et al. 2009a). El hecho de que las células NE expresen niveles muy bajos de CB1 y CB2, hace pensar que el efecto antiproliferativo mostrado por WIN es independiente de receptor. De hecho, los resultados de esta tesis doctoral muestran que los antagonistas de los receptores no revierten el efecto de dicho cannabinoide.

La clara disminución ejercida por WIN sobre los marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub, sobre la viabilidad celular y el aumento de los niveles de expresión del receptor CB2, son un gran aliciente, teniendo en cuenta la capacidad para evadir los efectos de la terapia que poseen las células NE. Más aún, el efecto que WIN produce sobre los niveles de expresión del receptor CB2 abre la posibilidad de utilizarlo en combinación con otros cannabinoides cuya afinidad sea específica para CB2, como JWH-015 o JWH-133, y así mediante tratamientos sinérgicos mejorar el efecto antiproliferativo ya observado con WIN.

4.2. Niveles de interleuquina-6.

A pesar de que el tratamiento con el cannabinoide WIN induce una disminución de los niveles de ARNm de IL-6 en células NE, el silenciamiento de IL-6 no impidió el efecto de WIN sobre los niveles de marcadores neuroendocrinos. Así, por lo tanto, estos resultados permiten establecer que las células NE sintetizan y secretan IL-6 como consecuencia del proceso de NED, aunque el efecto ejercido por el cannabinoide WIN sobre estas células no está mediado por IL-6.

En nuestro laboratorio se desarrolló otro modelo *in vitro* de NED que consiste en el tratamiento de células LNCaP durante 6 días con IL-6 humana recombinante a una dosis de 20 ng/ml. En estas condiciones las células desarrollan las características fenotípicas neuroendocrinas, se establecen los niveles elevados de NSE y β III Tub y se induce activación de la vía PI3K/Akt/mTOR. El tratamiento con el cannabinoide WIN impide tanto esta activación como el establecimiento de las características neuroendocrinas, de manera similar a cuando las células se cultivan en medio sin suero durante 6 días (Morell et al. 2016a). Con estos resultados se demuestra que el tratamiento con IL-6 por tiempo prolongado es un modelo *in vitro* en el que también

es posible observar el efecto del cannabinoide WIN sobre la diferenciación neuroendocrina de las células LNCaP.

A pesar de que el papel de IL-6 como inductor de NED en la células LNCaP está ampliamente establecido, los resultados mostrados en esta tesis doctoral indican que el efecto estimulador de las células NE sobre las células PC-3 y el efecto inhibitorio de WIN no están mediados por IL-6. Estudios posteriores deberán ser realizados para establecer si el efecto de WIN sobre los niveles de IL-6 tiene algún papel en otras acciones inducidas por las células NE.

4.3. Señalización celular.

En nuestro modelo celular de NED, WIN inhibe la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR. El tratamiento con el cannabinoide WIN, se realizó desde el inicio de la retirada de suero y el efecto inhibitorio sobre la fosforilación de Akt es fuerte y sostenido en el tiempo, ya que se observa a los 6 días posteriores al inicio de la retirada de suero (Morell et al. 2016a). Por esto se considera que el tratamiento con este cannabinoide sería una herramienta terapéutica de gran utilidad en el tratamiento del cáncer de próstata neuroendocrino.

Previamente a esta tesis doctoral, nuestro grupo de investigación estableció que los cannabinoides THC y JWH-015 son capaces de producir su acción antitumoral mediante la activación de autofagia dependiente de AMPK (Vara et al. 2011). Así, pues, analizamos el efecto de la activación de AMPK con el cannabinoide WIN en nuestras condiciones experimentales. Esta activación impidió la NED de las células LNCaP (Morell et al. 2016a). El hallazgo de este efecto observado, nos permite proponer a WIN como un activador de AMPK mediante el cual es posible impedir el desarrollo de NED. En la figura 69 se propone el mecanismo de acción de WIN sobre la células NE.

Sería de gran interés, en subsiguientes trabajos de investigación, analizar el estado de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y AMPK en tumores de cáncer de próstata neuroendocrino.

4.4. Efecto antitumoral.

Los efectos observados en esta tesis doctoral sobre la viabilidad, los niveles de marcadores neuroendocrinos y de receptores de cannabinoides demuestran que el cannabinoide WIN ejerce un claro efecto antiproliferativo *in vitro* del cáncer de próstata neuroendocrino.

Los resultados obtenidos en relación al efecto antitumoral de WIN en modelos *in vivo* están en consonancia con los observados *in vitro*. El tratamiento peritumoral con WIN es capaz de producir un ritmo de crecimiento tumoral inferior al de los tumores que solo reciben tratamiento con vehículo. Este resultado es similar tanto en tumores con presencia de células LNCaP como de células NE.

Para confirmar el efecto antitumoral de WIN en tumores con características neuroendocrinas, se utilizaron células PC-3, que se consideran una línea celular

representativa del carcinoma prostático neuroendocrino de células pequeñas, un tipo muy agresivo y poco frecuente de cáncer de próstata (Tai et al. 2011). En este trabajo se demuestra que WIN es capaz de disminuir la expresión de marcadores neuroendocrinos NSE y β III Tub en células PC-3. Además, al igual que el efecto observado con tumores mixtos de células PC-3+LNCaP y células PC-3+NE, en tumores de células PC-3 solas, el cannabinoide WIN es capaz de disminuir el ritmo de crecimiento. En tumores de células PC-3 tratados con WIN, se observa una disminución de NSE y β III Tub. Estos datos están recogidos en una publicación reciente de nuestro grupo de investigación (Morell et al. 2016a).

Por todo lo expuesto hasta aquí, consideramos que WIN podría suponer una opción terapéutica novedosa y adecuada para el tratamiento de tumores de cáncer de próstata con características neuroendocrinas.

Será parte del trabajo posterior estudiar los efectos que el cannabinoide WIN pudiera ejercer sobre la autofagia y los niveles de expresión de la proteína LAMP2.

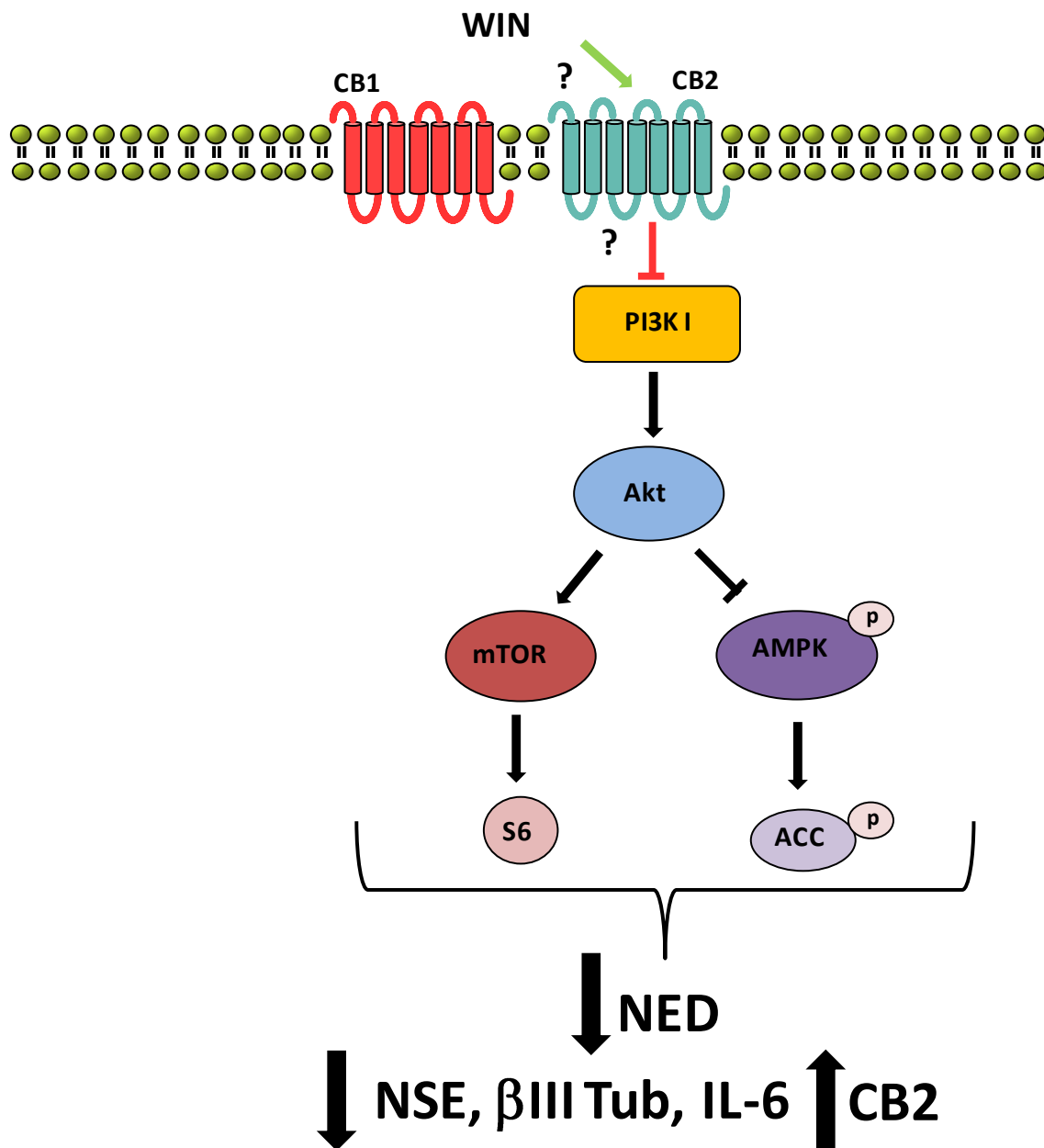


Figura 69. Posible mecanismo de acción del cannabinoide WIN 55,212-2 (WIN) en la diferenciación neuroendocrina (NED) de células de cáncer de próstata LNCaP.

CONCLUSIONES

1. La diferenciación neuroendocrina (NED) de células de cáncer de próstata LNCaP obtenida mediante la retirada de suero del medio de cultivo, es un modelo *in vitro* sencillo y robusto, que permite el estudio de las características fenotípicas y genotípicas asociadas a este fenómeno.
2. Las células NE estimulan el crecimiento de otras células, ya que la presencia de células NE en cultivos de células PC-3 ejerce un efecto estimulante sobre el crecimiento de éstas *in vitro*. Además, los sobrenadantes obtenidos de células NE ejercen un efecto estimulante sobre el crecimiento de células PC-3 *in vitro*. Por su parte, los tumores generados en ratones inmunodeprimidos por inyección de células PC-3+NE muestran un crecimiento superior al de los generados por la inyección de células PC-3+LNCaP.
3. La vía de señalización PI3K/Akt/mTOR está activada en la NED de las células de cáncer de próstata LNCaP. La inhibición de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR impide la NED de las células LNCaP.
4. La vía de señalización de AMPK está inhibida en la NED de las células de cáncer de próstata LNCaP. La activación de AMPK impide la NED de las células LNCaP.
5. Durante la NED de las células cáncer de próstata LNCaP se produce una activación de la autofagia y un aumento de la expresión de LAMP2. El silenciamiento génico de LAMP2 impide la NED de las células LNCaP. La inhibición farmacológica de la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR induce un bloqueo de la autofagia e impide la NED de las células LNCaP. La activación de AMPK induce un bloqueo de la autofagia e impide la NED de las células LNCaP.
6. Durante la NED de las células LNCaP se produce una disminución drástica de los niveles de receptores de cannabinoides CB1 Y CB2.
7. El tratamiento con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (WIN) impide la NED de las células LNCaP, ya que ejerce un efecto inhibitorio sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTOR y un efecto activador sobre la vía de señalización de AMPK.
8. El tratamiento de tumores xenógrafos de células PC-3, células PC-3+LNCaP y de células PC-3+NE con el cannabinoide sintético WIN 55,212-2 (WIN) disminuye el crecimiento de los mismos en comparación con aquellos que solo reciben tratamiento con vehículo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsson, P.A., 1999. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocrine-Related Cancer*, 6(4), pp.503–519.
- Adler, H.L. et al., 1999. Elevated levels of circulating interleukin-6 and transforming growth factor-beta1 in patients with metastatic prostatic carcinoma. *The Journal of urology*, 161(1), pp.182–7.
- Agarraberes, F.A., Terlecky, S.R. & Dice, J.F., 1997. An intralysosomal hsp70 is required for a selective pathway of lysosomal protein degradation. *The Journal of cell biology*, 137(4), pp.825–34.
- Alberti, C., 2010. Neuroendocrine differentiation in prostate carcinoma: focusing on its pathophysiologic mechanisms and pathological features. *Il Giornale di chirurgia*, 31(11-12), pp.568–74.
- Alexander, A., Smith, P.F. & Rosengren, R.J., 2009. Cannabinoids in the treatment of cancer. *Cancer Letters*, 285(1), pp.6–12.
- Antonarakis, E.S., Carducci, M.A. & Eisenberger, M.A., 2010. Novel targeted therapeutics for metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancer letters*, 291(1), pp.1–13.
- Aumüller, G. et al., 1999. Neurogenic origin of human prostate endocrine cells. *Urology*, 53(5), pp.1041–8.
- Axe, E.L. et al., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of cell biology*, 182(4), pp.685–701.
- Backer, J.M., Bourret, L. & Dice, J.F., 1983. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(8), pp.2166–70.
- Balakumaran, B.S. et al., 2009. MYC activity mitigates response to rapamycin in prostate cancer through eukaryotic initiation factor 4E-binding protein 1-mediated inhibition of autophagy. *Cancer research*, 69(19), pp.7803–10.
- Battaglia, S., Casali, A.M. & Botticelli, A.R., 1994. Age-related distribution of endocrine cells in the human prostate: a quantitative study. *Virchows Archiv*: an international journal of pathology, 424(2), pp.165–8.
- Beltran, H. et al., 2011. Molecular characterization of neuroendocrine prostate cancer and identification of new drug targets. *Cancer Discovery*, 1(6), pp.487–495.
- Bernales, S., McDonald, K.L. & Walter, P., 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS biology*, 4(12), p.e423.
- Betz, C. et al., 2013. Feature Article: mTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(31), pp.12526–34.

Betz, C. & Hall, M.N., 2013. Where is mTOR and what is it doing there? *The Journal of cell biology*, 203(4), pp.563–74.

Bifulco, M. et al., 2008. Endocannabinoids in endocrine and related tumours. *Endocrine-Related Cancer*, 15(2), pp.391–408.

Bifulco, M. & Di Marzo, V., 2002. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy: a call for further research. *Nature medicine*, 8(6), pp.547–50.

Birk, J.B. & Wojtaszewski, J.F.P., 2006. Predominant alpha2/beta2/gamma3 AMPK activation during exercise in human skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 577(Pt 3), pp.1021–32.

Blázquez, C. et al., 2006. Cannabinoid receptors as novel targets for the treatment of melanoma. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20(14), pp.2633–5.

van Bokhoven, A. et al., 2003. Spectral karyotype (SKY) analysis of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, 57(3), pp.226–44.

Bonkhoff, H., 1998. Neuroendocrine cells in benign and malignant prostate tissue: morphogenesis, proliferation, and androgen receptor status. *The Prostate. Supplement*, 8, pp.18–22.

Bonkhoff, H., 2001. Neuroendocrine differentiation in human prostate cancer. Morphogenesis, proliferation and androgen receptor status. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 12 Suppl 2, pp.S141–4.

Bonkhoff, H. & Remberger, K., 1996. Differentiation pathways and histogenetic aspects of normal and abnormal prostatic growth: a stem cell model. *The Prostate*, 28(2), pp.98–106.

Bonkhoff, H., Stein, U. & Remberger, K., 1995. Endocrine-paracrine cell types in the prostate and prostatic adenocarcinoma are postmitotic cells. *Human pathology*, 26(2), pp.167–70.

Bosier, B. et al., 2010. Functionally selective cannabinoid receptor signalling: Therapeutic implications and opportunities. *Biochemical Pharmacology*, 80(1), pp.1–12.

Bostwick, D.G. et al., 2004. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Reviews in urology*, 6(4), pp.171–9.

Bostwick, D.G. et al., 2002. Neuroendocrine expression in node positive prostate cancer: correlation with systemic progression and patient survival. *The Journal of urology*, 168(3), pp.1204–11.

Botti, J. et al., 2006. Autophagy signaling and the cogwheels of cancer. *Autophagy*, 2(2), pp.67–73.

Boya, P., Reggiori, F. & Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*, 15(7), pp.713–20.

Boyd, L.K., Mao, X. & Lu, Y.-J., 2012. The complexity of prostate cancer: genomic alterations and heterogeneity. *Nature reviews. Urology*, 9(11), pp.652–64.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, pp.248–254.

Bristol, M.L. et al., 2013. Autophagy inhibition for chemosensitization and radiosensitization in cancer: do the preclinical data support this therapeutic strategy? *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 344(3), pp.544–52.

Burchardt, T. et al., 1999. Transdifferentiation of prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in vitro and in vivo. *The Journal of urology*, 162(5), pp.1800–5.

Burkhart, C.A., Kavallaris, M. & Band Horwitz, S., 2001. The role of beta-tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochimica et biophysica acta*, 1471(2), pp.1–9.

Burney, S. et al., 2014. Diabetes and pancreatic cancer. *JOP: Journal of the pancreas*, 15(4), pp.319–21.

Campbell C, 2004. *Principios de Anatomía y Fisiología*, Tortora GJ-Derrisonson B 11ª edición, Editorial Panamericana, 2006, pag 1074).

Carling, D., Zammit, V.A. & Hardie, D.G., 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS letters*, 223(2), pp.217–22.

Castaneto, M.S. et al., 2014. Synthetic cannabinoids: Epidemiology, pharmacodynamics, and clinical implications. *Drug and Alcohol Dependence*, 144, pp.12–41.

Chakravarti, B., Ravi, J. & Ganju, R.K., 2014. Cannabinoids as therapeutic agents in cancer: current status and future implications. *Oncotarget*, 5(15), pp.5852–72.

Chalhoub, N. & Baker, S.J., 2009. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual review of pathology*, 4(1), pp.127–50.

Chang, L. et al., 2015. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 96(3), pp.507–517.

Chen, R.-J. et al., 2012. Monascuspiloin induces apoptosis and autophagic cell death in human prostate cancer cells via the Akt and AMPK signaling pathways. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(29), pp.7185–93.

Chen, Y. & Klionsky, D.J., 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of Cell Science*, 124(2), pp.161–170.

Cheville, J.C. et al., 2002. Metastatic prostate carcinoma to bone: clinical and pathologic features associated with cancer-specific survival. *Cancer*, 95(5), pp.1028–36.

Chiang, H.L. & Dice, J.F., 1988. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *The Journal of biological chemistry*, 263(14), pp.6797–805.

Chou, C.-C. et al., 2014. AMPK reverses the mesenchymal phenotype of cancer cells by targeting the Akt-MDM2-Foxo3a signaling axis. *Cancer research*, 74(17), pp.4783–95.

Chung, S.C. et al., 2009. A high cannabinoid CB(1) receptor immunoreactivity is associated with disease severity and outcome in prostate cancer. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, 45(1), pp.174–82.

Cohen, R.J. et al., 1993. The neuroendocrine cell population of the human prostate gland. *The Journal of urology*, 150(2 Pt 1), pp.365–8.

Cortés, M.A. et al., 2012. EGF promotes neuroendocrine-like differentiation of prostate cancer cells in the presence of LY294002 through increased ErbB2 expression independent of the phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway. *Carcinogenesis*, 33(6), pp.1169–77.

Cox, M.E., Deeble, P.D. & Lakhani, S., 1999. Acquisition of Neuroendocrine Characteristics by Prostate Tumor Cells Is Reversible: Implications for Prostate Cancer Progression Acquisition of Neuroendocrine Characteristics by Prostate Tumor Cells Is Reversible: Implications for Prostate Cancer Progr. , pp.3821–3830.

Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: Many paths to the same end. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 263(1/2), pp.55–72.

Cuervo, A.M., 2010. Chaperone-mediated autophagy: Selectivity pays off. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(3), pp.142–150.

Cuervo, A.M. & Dice, J.F., 1996. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 273(5274), pp.501–3.

Czifra, G. et al., 2009. Increased expressions of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1 in human prostate carcinoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 135(4), pp.507–14.

Dalby, K.N. et al., 2010. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy*, 6(3), pp.322–9.

Dalton, G.D. et al., 2009. Signal transduction via cannabinoid receptors. *CNS & neurological disorders drug targets*, 8(6), pp.422–31.

Damaghi, M. et al., 2015. Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nature communications*, 6, p.8752.

Davies SP, Helps NR, Cohen PT, H.D., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C α and native bovine protein phosphatase-2A c. *FEBS Letters*, 377(3), pp.421–425.

Deeble, P.D. et al., 2001. Interleukin-6- and Cyclic AMP-Mediated Signaling Potentiates Neuroendocrine Differentiation of LNCaP Prostate Tumor Cells Interleukin-6- and Cyclic AMP-Mediated Signaling Potentiates Neuroendocrine Differentiation of LNCaP Prostate Tumor Cells. , 21(24), pp.8471–8482.

Delk, N.A. & Farach-Carson, M.C., 2012. Interleukin-6: A bone marrow stromal cell paracrine signal that induces neuroendocrine differentiation and modulates autophagy in bone metastatic PCa cells. *Autophagy*, 8(4), pp.650–663.

DeLong, G.T. et al., 2010. Pharmacological evaluation of the natural constituent of *Cannabis sativa*, cannabichromene and its modulation by Δ^9 -tetrahydrocannabinol. *Drug and Alcohol Dependence*, 112(1-2), pp.126–133.

Deng, X. et al., 2011. Ionizing radiation induces neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells in vitro, in vivo and in prostate cancer patients. *American journal of cancer research*, 1(7), pp.834–44.

Deretic, V. & Levine, B., 2009. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell host & microbe*, 5(6), pp.527–49.

DeSantis, C.E. et al., 2014. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 64(4), pp.252–271.

Deter, R.L. & De Duve, C., 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *The Journal of cell biology*, 33(2), pp.437–49.

Devane, W.A. et al., 1988. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Molecular pharmacology*, 34(5), pp.605–13.

Devane, W.A. et al., 1992. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5090), pp.1946–9.

Díaz-Laviada, I., 2011. The endocannabinoid system in prostate cancer. *Nature reviews. Urology*, 8(10), pp.553–61.

Díaz-Laviada, I. & Ruiz-Llorente, L., 2005. Signal transduction activated by cannabinoid receptors. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 5(7), pp.619–30.

Dice, J.F., 2007. Chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 3(4), pp.295–9.

Dice, J.F. & Chiang, H.L., 1989. Peptide signals for protein degradation within lysosomes. *Biochemical Society symposium*, 55, pp.45–55.

Dice, J.F. & Terlecky, S.R., 1990. Targeting of cytosolic proteins to lysosomes for degradation. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, 7(3), pp.211–33.

Drachenberg, D.E. et al., 1999. Circulating levels of interleukin-6 in patients with hormone refractory prostate cancer. *The Prostate*, 41(2), pp.127–33.

Edlind, M.P. & Hsieh, A.C., 2014. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian journal of andrology*, 16(October 2013), pp.378–86.

Egan, D.F. et al., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6016), pp.456–61.

ElSohly, M.A. & Slade, D., 2005. Chemical constituents of marijuana: The complex mixture of natural cannabinoids. *Life Sciences*, 78(5), pp.539–548.

Eminaga, O. et al., 2013. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and topographical distribution in 1,374 prostatectomy specimens: existence of HGPIN near prostate cancer. *The Prostate*, 73(10), pp.1115–22.

Endsley, M.P. et al., 2007. Diverse roles of 2-arachidonoylglycerol in invasion of prostate carcinoma cells: Location, hydrolysis and 12-lipoxygenase metabolism. *International journal of cancer*, 121(5), pp.984–91.

Engelman, J.A., Luo, J. & Cantley, L.C., 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics*, 7(8), pp.606–19.

Eskelinen, E.-L., 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy*, 1(1), pp.1–10.

Fader, C.M. & Colombo, M.I., 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.70–8.

Falasca M, & Maffucci T., 2012. Regulation and cellular functions of class II phosphoinositide 3-kinases. *Biochem J*, 43(3), pp. 587-601.

Fang, Y. et al., 2001. Phosphatidic acid-mediated mitogenic activation of mTOR signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5548), pp.1942–5.

Farrow, J.M., Yang, J.C. & Evans, C.P., 2015. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. , 11(9), pp.508–516.

Faubert, B. et al., 2013. AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo. *Cell metabolism*, 17(1), pp.113–24.

Felder, C.C. & Glass, M., 1998. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38(1), pp.179–200.

Ferlay, J. et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), pp.E359–86.

Feyrter, F. 1951 Über das urogenitale Helle-Zellen-System des Menschen. *Mikroskopische Anatomie Forschung* 57, pp. 324-326.

Fimia et al., 2007. Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature*. 447 (7148), pp.1121-5.

Flavin, R., Zadra, G. & Loda, M., 2011. Metabolic alterations and targeted therapies in prostate cancer. *The Journal of pathology*, 223(2), pp.283–294.

Floc’h, N. & Abate-Shen, C., 2012. The promise of dual targeting Akt/mTOR signaling in lethal prostate cancer. *Oncotarget*, 3(12), pp.1483–4.

Fowler, C.J., Hammarsten, P. & Bergh, A., 2010. Tumour cannabinoid CB1 receptor and phosphorylated epidermal growth factor receptor expression are additive prognostic markers for prostate cancer. *Plos One*, 5(12), pp.1–7.

Franco, I. et al.. 2014. PI3K class II alpha controls spatially restricted endosomal PtdIns3P and Rab11 activation to promote primary cilium function. *Dev Cell.*; 28 (6), pp.647–58.

Frigo, D.E. et al., 2011. CaM kinase kinase beta-mediated activation of the growth regulatory kinase AMPK is required for androgen-dependent migration of prostate cancer cells. *Cancer research*, 71(2), pp.528–37.

Fruman, D. & Romel, C. et al., 2014. PI3K and cancer: lessons, challenges and opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(2), pp.140-56.

Fujita, N. et al., 2008. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Molecular biology of the cell*, 19(5), pp.2092–100.

Fukuda, M., 1991. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry*, 266(32), pp.21327–21330.

Furuta, N., Yoshimori, T. & Amano, A., 2010. Mediator molecules that fuse autophagosomes and lysosomes. *Autophagy*, 6(3), pp.417–8.

Gaidarov, I. et al., 2001. The class II phosphoinositide 3-kinase C2alpha is activated by clathrin and regulates clathrin-mediated membrane trafficking. *Molecular cell*, 7(2), pp.443–9.

Galiègue, S. et al., 1995. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *European journal of biochemistry / FEBS*, 232(1), pp.54–61.

Galluzzi, L. et al., 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*, 34(7), pp. 856-80.

Galve-Roperh, I. et al., 2000. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nature medicine*, 6(3), pp.313–9.

Galve-Roperh, I. et al., 2013. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Progress in lipid research*, 52(4), pp.633–50.

Gaoni, Y. & Mechoulam R., 1964. Isolation, structure and partial synthesis of an active constituent of hashish. *J Amer Chem Soc.*;86, pp.1646–1647

Gatica, D. et al., 2015. Molecular mechanisms of autophagy in the cardiovascular system. *Circulation research*, 116(3), pp.456–67.

Giri, D., Ozen, M. & Ittmann, M., 2001. Interleukin-6 Is an Autocrine Growth Factor in Human Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*, 159(6), pp.2159–2165.

Gleason, D.F. & Mellinger, G.T., 1974. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *The Journal of urology*, 111(1), pp.58–64.

Gonzalez, E. & McGraw, T.E., 2009. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(16), pp.2502–8.

Gratzke, C. et al., 2010. Localization and function of cannabinoid receptors in the corpus cavernosum: basis for modulation of nitric oxide synthase nerve activity. *European urology*, 57(2), pp.342–8.

Greaves, M. & Maley, C.C., 2012. Clonal evolution in cancer. *Nature*, 481(7381), pp.306–13.

Greineisen, W.E. & Turner, H., 2010. Immunoactive effects of cannabinoids: Considerations for the therapeutic use of cannabinoid receptor agonists and antagonists. *International Immunopharmacology*, 10(5), pp.547–555.

Grobholz, R. et al., 2005. Influence of neuroendocrine tumor cells on proliferation in prostatic carcinoma. *Human pathology*, 36(5), pp.562–70.

Guindon, J. & Hohmann, A.G., 2011. The endocannabinoid system and cancer: Therapeutic implication. *British Journal of Pharmacology*, 163(7), pp.1447–1463.

Guo, Z. et al., 2006. Regulation of androgen receptor activity by tyrosine phosphorylation. *Cancer cell*, 10(4), pp.309–19.

Gutiérrez-Cañas, I. et al., 2005. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *The Prostate*, 63(1), pp.44–55.

Guzmán, M. et al., 2006. A pilot clinical study of Delta9-tetrahydrocannabinol in patients with recurrent glioblastoma multiforme. *British journal of cancer*, 95(2), pp.197–203.

Guzmán, M., 2003. Neurons on cannabinoids: dead or alive? *British Journal of Pharmacology*, 140(3), pp.439–440.

Gwinn, D.M. et al., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30(2), pp.214–26.

Hailey, D.W. et al., 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell*, 141(4), pp.656–67.

Hanada, T. et al., 2007. The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 282(52), pp.37298–37302.

Hansson, J. & Abrahamsson, P.-A., 2003. Neuroendocrine differentiation in prostatic carcinoma. *Scandinavian journal of urology and nephrology. Supplementum*, (212), pp.28–36.

Hardie, D.G., 2007a. AMP-activated protein kinase as a drug target. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 47, pp.185–210.

Hardie, D.G., 2011. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & development*, 25(18), pp.1895–908.

Hardie, D.G., 2007b. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), pp.774–785.

Hardie, D.G., 2008. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *International journal of obesity* (2005), 32 Suppl 4, pp.S7–S12.

Hardie, D.G., 2012. Organismal carbohydrate and lipid homeostasis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(5).

Hardie, D.G., 1989. Regulation of fatty acid synthesis via phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase. *Progress in lipid research*, 28(2), pp.117–46.

Hardie, D.G., Schaffer, B.E. & Brunet, A., 2016. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. *Trends in Cell Biology*, 26(3), pp.190–201.

Hattori, Y. et al., 2008. High molecular weight adiponectin activates AMPK and suppresses cytokine-induced NF- κ B activation in vascular endothelial cells. *FEBS Letters*, 582(12), pp.1719–1724.

Hawley, S.A. et al., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology*, 2(4), p.28.

Hay, N. & Sonenberg, N., 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18(16), pp.1926–45.

Hayashi-Nishino, M. et al., 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature cell biology*, 11(12), pp.1433–7.

He, C. & Klionsky, D.J., 2009. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics*, 43, pp.67–93.

He, Z. et al., 2012. Cell killing and radiosensitizing effects of atorvastatin in PC3 prostate cancer cells. *Journal of radiation research*, 53(2), pp.225–33.

Hengartner, M.O. & Bryant, J.A., 2000. Apoptotic cell death: from worms to wombats ... but what about the weeds? *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 52, pp.1–12.

Hermanson, D.J. & Marnett, L.J., 2011. Cannabinoids, endocannabinoids, and cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 30(3-4), pp.599–612.

Hillard, C.J., Harris, R.A. & Bloom, A.S., 1985. Effects of the cannabinoids on physical properties of brain membranes and phospholipid vesicles: fluorescence studies. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 232(3), pp.579–88.

Hirano, D. et al., 2004. Neuroendocrine Differentiation in Hormone Refractory Prostate Cancer Following Androgen Deprivation Therapy. *European Urology*, 45(5), pp.586–592.

Horman, S. et al., 2006. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), pp.5335–40.

Horwich, A., 2006. Systemic treatment for prostate cancer. *Annals of Oncology*, 17(suppl 10), pp.211–213.

Howlett, A.C., 2005. Cannabinoid receptor signaling. *Handbook of experimental pharmacology*, (168), pp.53–79.

Howlett, A.C. et al., 2002. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological reviews*, 54(2), pp.161–202.

Huang, J. et al., 2006. Immunohistochemical characterization of neuroendocrine cells in prostate cancer. *The Prostate*, 66(13), pp.1399–406.

Hudson et al., 2003. Novel ligands for the investigation of imidazoline receptors and their binding proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1009, pp.302–8.

Hudson, D.L., 2004. Epithelial stem cells in human prostate growth and disease. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 7(3), pp.188–94.

Hudson, D.L. et al., 2000. Proliferative heterogeneity in the human prostate: evidence for epithelial stem cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(8), pp.1243–50.

Hudson, E.R. et al., 2003. A novel domain in AMP-activated protein kinase causes glycogen storage bodies similar to those seen in hereditary cardiac arrhythmias. *Current biology*, 13(10), pp.861–6.

Huss, W.J., Gregory, C.W. & Smith, G.J., 2004. Neuroendocrine cell differentiation in the CWR22 human prostate cancer xenograft: association with tumor cell proliferation prior to recurrence. *The Prostate*, 60(2), pp.91–7.

Iczkowski, K.A. & Lucia, M.S., 2011. Current perspectives on Gleason grading of prostate cancer. *Current urology reports*, 12(3), pp.216–22.

Isaacs, J.T. & Coffey, D.S., 1989. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *The Prostate. Supplement*, 2, pp.33–50.

Iseli, T.J. et al., 2005. AMP-activated protein kinase beta subunit tethers alpha and gamma subunits via its C-terminal sequence (186-270). *The Journal of biological chemistry*, 280(14), pp.13395–400.

Ismail A, H.R. et al., 2002. Androgen ablation promotes neuroendocrine cell differentiation in dog and human prostate. *The Prostate*, 51(2), pp.117–25.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N., 2012. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell*, 151(6), pp.1256–1269.

Itakura, E. & Mizushima, N., 2010. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy*, 6(6), pp.764–76.

Ito, T. et al., 2001. Up-regulation of neuroendocrine differentiation in prostate cancer after androgen deprivation therapy, degree and androgen independence. *Oncology reports*, 8(6), pp.1221–4.

Itoh, T. et al., 2008. Golgi-resident Small GTPase Rab33B Interacts with Atg16L and Modulates Autophagosome Formation. *Molecular Biology of the Cell*, 19(7), pp.2916–2925.

Jäger, S. et al., 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117(Pt 20), pp.4837–48.

Jemal, A. et al., 2015. Prostate Cancer Incidence and PSA Testing Patterns in Relation to USPSTF Screening Recommendations. *JAMA*, 314(19), pp.2054–61.

Jongsma, J. et al., 2000. Androgen deprivation of the PC-310 [correction of prohormone convertase-310] human prostate cancer model system induces neuroendocrine differentiation. *Cancer research*, 60(3), pp.741–8.

Jongsma, J. et al., 1999. Kinetics of Neuroendocrine Differentiation in an Androgen-Dependent Human Prostate Xenograft Model. *The American Journal of Pathology*, 154(2), pp.543–551.

Joniau, S. et al., 2013. Controversies on individualized prostate cancer care: gaps in current practice. *Therapeutic advances in urology*, 5(5), pp.233–44.

Jung, C.H. et al., 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular biology of the cell*, 20(7), pp.1992–2003.

Kabeya, Y., 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), pp.5720–5728.

Kahn, B.B. et al., 2005. AMP-activated protein kinase: Ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metabolism*, 1(1), pp.15–25.

Kaplan-Lefko, P.J. et al., 2003. Pathobiology of autochthonous prostate cancer in a pre-clinical transgenic mouse model. *The Prostate*, 55(3), pp.219–37.

Kato, K. et al., 1983. Immunoassay of three enolase isozymes in human serum and in blood cells. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 127(3), pp.353–63.

Kaushik, S. & Cuervo, A.M., 2009. Chapter 19 Methods to Monitor Chaperone-Mediated Autophagy 1st ed., Elsevier Inc.

Kihara, A. et al., 2001. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO reports*, 2(4), pp.330–5.

Kim, B. et al., 2015. Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, 290(31), pp.19146–57.

Kim, D.-H. et al., 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), pp.163–75.

Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S. & Lemasters, J.J., 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics*, 462(2), pp.245–53.

Kim, J. et al., 2016. AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(4), p.e224.

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

Kim, J. & Guan, K.-L., 2013. AMPK connects energy stress to PIK3C3/VPS34 regulation. *Autophagy*, 9(7), pp.1110–1.

Kim, W.J., 2015. Is 5'-AMP-activated protein kinase both jekyll and hyde in bladder cancer? *International Neurourology Journal*, 19(2), pp.55–66.

Kirisako, T. et al., 2000. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *The Journal of cell biology*, 151(2), pp.263–76.

Kirkin, V. et al., 2009. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets. *Autophagy*, 5(5), pp.732–3.

Klionsky DJ et al., 2016. Guidelines for use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), pp.1–222.

Komiya, A. et al., 2013. The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens among castration-resistant prostate cancer patients. *Molecular and clinical oncology*, 1(2), pp.257–262.

Kon, M. et al., 2011. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Science translational medicine*, 3(109), pp.109/117.

Kraft, C. et al., 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease. *Nature cell biology*, 10(5), pp.602–10.

Krijnen, J.L. et al., 1993. Do neuroendocrine cells in human prostate cancer express androgen receptor? *Histochemistry*, 100(5), pp.393–8.

Kuma, A., 2002. Formation of the 350-kDa Apg12-Apg5middle dotApg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), pp.18619–18625.

Kumano, M. et al., 2012. Cotargeting stress-activated Hsp27 and autophagy as a combinatorial strategy to amplify endoplasmic reticular stress in prostate cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 11(8), pp.1661–71.

Kung, H.J., 2011. Targeting Tyrosine Kinases and Autophagy in Prostate Cancer. *Hormones and Cancer*, 2(1), pp.38–46.

Labbé, D. et al., 2014. Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. *Oncogene*, 34(August 2014), pp.4683–4691.

Lamoureux, F. et al., 2013. Blocked autophagy using lysosomotropic agents sensitizes resistant prostate tumor cells to the novel Akt inhibitor AZD5363. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(4), pp.833–44.

Lamoureux, F. & Zoubeidi, A., 2013. Dual inhibition of autophagy and the AKT pathway in prostate cancer. *Autophagy*, 9(7), pp.1119–20.

Lee, C.H., Akin-Olugbade, O. & Kirschenbaum, A., 2011. Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), pp.565–575.

Lee, C.-W. et al., 2012. AMPK promotes p53 acetylation via phosphorylation and inactivation of SIRT1 in liver cancer cells. *Cancer research*, 72(17), pp.4394–404.

Lee, I.H. & Finkel, T., 2009. Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry*, 284(10), pp.6322–8.

Lee, J.T. et al., 2008. Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(12), pp.1745–62.

Lee, S.O. et al., 2007. Interleukin-6 undergoes transition from growth inhibitor associated with neuroendocrine differentiation to stimulator accompanied by androgen receptor activation during LNCaP prostate cancer cell progression. *The Prostate*, 67(7), pp.764–73.

van Leenders, G. et al., 2000. Demonstration of intermediate cells during human prostate epithelial differentiation in situ and in vitro using triple-staining confocal scanning microscopy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(8), pp.1251–8.

Levine, B. & Kroemer, G., 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), pp.27–42.

Liang, C. et al., 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, 10(7), pp.776–87.

Liang, J. et al., 2007. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nature cell biology*, 9(2), pp.218–24.

Liang, J. & Mills, G.B., 2013. AMPK: a contextual oncogene or tumor suppressor? *Cancer research*, 73(10), pp.2929–35.

Liang, X.H. et al., 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*, 402(6762), pp.672–6.

Lin, H.K. et al., 2001. Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(13), pp.7200–5.

Lin, K.-C. et al., 2016. Inhibition of AMPK through Lyn-Syk-Akt enhances FcεRI signal pathways for allergic response. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 94(2), pp.183–94.

Liu, J. et al., 2011. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer letters*, 300(2), pp.105–14.

Liu, P. et al., 2009. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nature reviews. Drug discovery*, 8(8), pp.627–44.

Long, R.M. et al., 2005. Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies. *Clinical science (London, England)*: 1979, 108(1), pp.1–11.

Lu, H.-C. & Mackie, K., 2016. An Introduction to the Endogenous Cannabinoid System. *Biological psychiatry*, 79(7), pp.516–25.

De Luca, A. et al., 2012. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*, 16 Suppl 2, pp.S17–27.

Luo, Z., 2010. AMPK as a metabolic tumor suppressor: control of metabolism and cell growth. , 48(Suppl 2), pp.1–6.

Mackie, K., 2005. Distribution of cannabinoid receptors in the central and peripheral nervous system. Handbook of experimental pharmacology, (168), pp.299–325.

Mahmood, Z. & Shukla, Y., 2010. Death receptors: targets for cancer therapy. Experimental cell research, 316(6), pp.887–99.

Maitland, N.J. et al., 2011. Prostate cancer stem cells: do they have a basal or luminal phenotype? Hormones & cancer, 2(1), pp.47–61.

Malagarie-Cazenave, S. et al., 2011. The vanilloid capsaicin induces IL-6 secretion in prostate PC-3 cancer cells. Cytokine, 54(3), pp.330–7.

Mariño, G. et al., 2007. Tissue-specific autophagy alterations and increased tumorigenesis in mice deficient in Atg4C/autophagin-3. The Journal of biological chemistry, 282(25), pp.18573–83.

Martin, B., 1986. Cellular effects of cannabinoids. Pharmacol Rev., 38(1), pp.45–74.

Martin-Orozco, R.M. et al., 2007. EGF prevents the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells Induced by serum deprivation: the modulator role of PI3K/Akt. Neoplasia, 9(8), pp.614–24.

De Marzo, A.M. et al., 1999. Proliferative Inflammatory Atrophy of the Prostate. The American Journal of Pathology, 155(6), pp.1985–1992.

De Marzo, A.M., Nakai, Y. & Nelson, W.G., 2007. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations, 25(5), pp.398–400.

Massey, A.C. et al., 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103(15), pp.5805–10.

Massie, C.E. et al., 2011. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. The EMBO journal, 30(13), pp.2719–33.

Mathew, R., Karantza-Wadsworth, V. & White, E., 2007. Role of autophagy in cancer. Nature reviews. Cancer, 7(12), pp.961–7.

Matsuda, L.A. et al., 1990. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. Nature, 346(6284), pp.561–4.

Matsuda-Lennikov, M., Suizu, F., Hirata, N. et al., 2014. Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. PloS one, 9(1):e79795.

Matsunaga, K., Noda, T. & Yoshimori, T., 2009. Binding Rubicon to cross the Rubicon. Autophagy, 5(6), pp.876–7.

McNeal, J.E., 1988. Normal anatomy of the prostate and changes in benign prostatic hypertrophy and carcinoma. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*, 9(5), pp.329–34.

McNeal, J.E., 1968. Regional morphology and pathology of the prostate. *American journal of clinical pathology*, 49(3), pp.347–57.

McVary, K.T., 2007. A review of combination therapy in patients with benign prostatic hyperplasia. *Clinical Therapeutics*, 29(3), pp.387–398.

Mehrpour, M. et al., 2010. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells. *Cell Research*, 20(7), pp.748–762.

Meijer, A.J. & Codogno, P., 2007. AMP-activated protein kinase and autophagy. *Autophagy*, 3(3), pp.238–40.

Meijer, A.J. & Codogno, P., 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(12), pp.2445–62.

Melck, D. et al., 2000. Suppression of nerve growth factor Trk receptors and prolactin receptors by endocannabinoids leads to inhibition of human breast and prostate cancer cell proliferation. *Endocrinology*, 141(1), pp.118–26.

Merlo, L.M.F. et al., 2006. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nature reviews. Cancer*, 6(12), pp.924–35.

Michalaki, V. et al., 2004. Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer. *British journal of cancer*, 90(12), pp.2312–6.

Mijaljica, D., Prescott, M. & Devenish, R.J., 2011. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*, 7(7), pp.673–82.

Mimeault, M., et al., 2003. Anti-proliferative and apoptotic effects of anandamide in human prostatic cancer cell lines: implication of epidermal growth factor receptor down-regulation and ceramide production. *The Prostate*, 56(1), pp.1–12.

Mizushima, N. et al., 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182), pp.1069–75.

Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes & development*, 21(22), pp.2861–73.

Morell, C., et al., 2016a. The cannabinoid WIN 55,212-2 prevents neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 19(3), pp.248-57.

Morell, C., et al., 2016b. Up-regulated expression of LAMP2 and autophagy activity during neuroendocrine differentiation of prostate cancer LNCaP cells. *Plos One*, 11(9), pp. e0162977.

Morgan, N.H., Stanford, I.M. & Woodhall, G.L., 2009. Functional CB2 type cannabinoid receptors at CNS synapses. *Neuropharmacology*, 57(4), pp.356–368.

Munkley, J. et al., 2015. The PI3K regulatory subunit gene PIK3R1 is under direct control of androgens and repressed in prostate cancer cells. *Oncoscience*, 2(9), pp.755–64.

Munro, S., Thomas, K.L. & Abu-Shaar, M., 1993. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, 365(6441), pp.61–5.

Munson, A.E. et al., 1975. Antineoplastic activity of cannabinoids. *Journal of the National Cancer Institute*, 55(3), pp.597–602.

Murillo, H. et al., 2001. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology*, 142(11), pp.4795–805.

Narita, M., Young, A.R.J. & Narita, M., 2009. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy*, 5(7), pp.1046–7.

Nelson, E.C. et al., 2007. Clinical implications of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 10(1), pp.6–14.

Nguyen, H.G. et al., 2014. Targeting autophagy overcomes Enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cells and improves therapeutic response in a xenograft model. *Oncogene*, 33(36), pp.4521–30.

Ni, J. et al., 2013. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 45(12), pp.2736–48.

Nikan, M., Nabavi, S.M. & Manayi, A., 2016. Ligands for cannabinoid receptors, promising anticancer agents. *Life Sciences*, 146, pp.124–130.

Nithipatikom, K. et al., 2004. 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer research*, 64(24), pp.8826–30.

Nobukuni, T. et al., 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(40), pp.14238–43.

Oesterling, J.E., 1992. Benign prostatic hyperplasia. Its natural history, epidemiologic characteristics, and surgical treatment. *Archives of family medicine*, 1(2), pp.257–66.

Oesterling, J.E., 1996. Early detection of prostate cancer. Decreasing the mortality rate. *Minnesota medicine*, 79(4), pp.46–9.

Ohsumi, Y., 2001. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2(3), pp.211–6.

Okamoto, M., Lee, C. & Oyasu, R., 1997a. Autocrine effect of androgen on proliferation of an androgen responsive prostatic carcinoma cell line, LNCaP: role of interleukin-6. *Endocrinology*, 138(11), pp.5071–4.

- Okamoto, M., Lee, C. & Oyasu, R., 1997b. Interleukin-6 as a paracrine and autocrine growth factor in human prostatic carcinoma cells in vitro. *Cancer research*, 57(1), pp.141–6.
- Olea-Herrero, N. et al., 2009a. Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: involvement of CB2. *British journal of cancer*, 101(6), pp.940–50.
- Olea-Herrero, N. et al., 2009b. The cannabinoid R+ methanandamide induces IL-6 secretion by prostate cancer PC3 cells. *Journal of immunotoxicology*, 6(4), pp.249–56.
- Pacher, P., Bátkai, S. & Kunos, G., 2006. The endocannabinoid system as an emerging target of pharmacotherapy. *Pharmacological reviews*, 58(3), pp.389–462.
- Packer, J.R. & Maitland, N.J., 2016. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), pp.1238–1260.
- Pantelouris, E.M., 1968. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature*, 217(5126), pp.370–1.
- Papandreou, I. et al., 2008. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell death and differentiation*, 15(10), pp.1572–81.
- Park, H.U. et al., 2009. AMP-activated protein kinase promotes human prostate cancer cell growth and survival. *Molecular cancer therapeutics*, 8(4), pp.733–41.
- Parzych, K.R. & Klionsky, D.J., 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), pp.460–73.
- Patel, K.D. et al., 2010. Cannabinoid CB(2) receptors in health and disease. *Current medicinal chemistry*, 17(14), pp.1393–410.
- Pearse, A.G.E., 1969. The cytochemistry and ultrastructure of polypeptide hormone-producing cells of the APUD series and the embryologic, physiologic, and pathologic implications of the concept. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17 pp.303-313.
- Perry, A.S. et al., 2010. The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer. *Nature reviews. Urology*, 7(12), pp.668–80.
- Pertwee, R.G. et al., 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB₁ and CB₂. *Pharmacological reviews*, 62(4), pp.588–631.
- Pertwee, R.G., 2012. Targeting the endocannabinoid system with cannabinoid receptor agonists: pharmacological strategies and therapeutic possibilities. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367(1607), pp.3353–63.
- De Petrocellis, L. et al., 2013. Non-THC cannabinoids inhibit prostate carcinoma growth in vitro and in vivo: Pro-apoptotic effects and underlying mechanisms. *British Journal of Pharmacology*, 168(1), pp.79–102.

Pisanti, S. & Bifulco, M., 2009. Endocannabinoid system modulation in cancer biology and therapy. *Pharmacological Research*, 60(2), pp.107–116.

Polekhina, G. et al., 2003. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current biology*, 13(10), pp.867–71.

Portt, L. et al., 2011. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochimica et biophysica acta*, 1813(1), pp.238–59.

Postma, R., 2006. Treatment of prostate cancer. *Annals of Oncology*, 17(suppl 10), pp.207–210.

Pretl K. 1944. Zur Frage der Endokrinie der menschlichen Vorsteherdruse. *Virchows Arch A*; 312: 392–404).

Pugh, T.J. et al., 2013. Radiation therapy modalities in prostate cancer. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 11(4), pp.414–21.

Putzi, M.J. & De Marzo, A.M., 2000. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*, 56(5), pp.828–32.

Qiu, Y. et al., 1998. Etk/Bmx, a tyrosine kinase with a pleckstrin-homology domain, is an effector of phosphatidylinositol 3'-kinase and is involved in interleukin 6-induced neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), pp.3644–9.

Qu, X. et al., 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation*, 112(12), pp.1809–20.

Qi, W., Morales, C., Cooke, L. et al., 2015. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *Oncotarget*, 6(39), pp. 41976-87.

Quon, H., Loblaw, A. & Nam, R., 2011. Dramatic increase in prostate cancer cases by 2021. *BJU international*, 108(11), pp.1734–8.

Ramos-Torres, Á. et al., 2015. The pepper's natural ingredient capsaicin induces autophagy blockage in prostate cancer cells. *Oncotarget*, 7(2), pp. 1569-83.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., et al., 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature cell biology*, 12(8), pp.747–57.

Ravikumar, B., Moreau, K. & Rubinsztein, D.C., 2010. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy*, 6(8), pp.1184–6.

Rick, F.G. & Schally, A. V., 2015. Bench-to-bedside development of agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for treatment of advanced prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 33(6), pp.270–274.

Risbridger, G.P., Almahbobi, G.A. & Taylor, R.A., 2005. Early prostate development and its association with late-life prostate disease. *Cell and tissue research*, 322(1), pp.173–81.

Rodriguez, M. & Potter, D.A., 2013. CYP1A1 regulates breast cancer proliferation and survival. *Molecular cancer research: MCR*, 11(7), pp.780–92.

Roudier, M.P. et al., 2003. Bone histology at autopsy and matched bone scintigraphy findings in patients with hormone refractory prostate cancer: the effect of bisphosphonate therapy on bone scintigraphy results. *Clinical & experimental metastasis*, 20(2), pp.171–80.

Ruiz, L., Miguel, A. & Díaz-Laviada, I., 1999. Delta9-tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS letters*, 458(3), pp.400–4.

Ruiz-Llorente, L. et al., 2004. Characterization of an anandamide degradation system in prostate epithelial PC-3 cells: synthesis of new transporter inhibitors as tools for this study. *British journal of pharmacology*, 141(3), pp.457–67.

Ruiz-Llorente, L. et al., 2003. Expression of functionally active cannabinoid receptor CB1 in the human prostate gland. *The Prostate*, 54(2), pp.95–102.

Russo, M. et al., 2010. Exploring death receptor pathways as selective targets in cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 80(5), pp.674–82.

Joniau, S. et al., 2013. Minimally invasive vs open radical prostatectomy in high-risk prostate cancer: Comparing apples and pears? *BJU International*, 112(6), pp.711–712.

Saftig, P. & Klumperman, J., 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(9), pp.623–635.

Sagnak, L. et al., 2011. Prognostic significance of neuroendocrine differentiation in prostate adenocarcinoma. *Clinical Genitourinary Cancer*, 9(2), pp.73–80.

Saha, T., 2012. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*, 8(11), pp.1643–56.

Salazar, M. et al., 2009. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *The Journal of clinical investigation*, 119(5), pp.1359–1372.

Sánchez, C. et al., 2001. Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer research*, 61(15), pp.5784–9.

Sánchez, M.G. et al., 2003. Enhancement of androgen receptor expression induced by (R)-methanandamide in prostate LNCaP cells. *FEBS Letters*, 555(3), pp.561–566.

Sanders, M.J. et al., 2007a. Defining the mechanism of activation of AMP-activated protein kinase by the small molecule A-769662, a member of the thienopyridone family. *The Journal of biological chemistry*, 282(45), pp.32539–48.

Sanders, M.J. et al., 2007b. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *The Biochemical journal*, 403(1), pp.139–48.

Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, V.M., et al., 2005. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Research*, 65(5), pp.1635–1641.

Sarfaraz, S., Afaq, F., Adhami, V.M., et al., 2006. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry*, 281(51), pp.1635–1641.

Sarfaraz, S. et al., 2008. Cannabinoids for cancer treatment: Progress and promise. *Cancer Research*, 68(2), pp.339–342.

Sauer, C.G., Roemer, A. & Grobholz, R., 2006. Genetic analysis of neuroendocrine tumor cells in prostatic carcinoma. *The Prostate*, 66(3), pp.227–34.

Scaglia, N. et al., 2014. De novo fatty acid synthesis at the mitotic exit is required to complete cellular division. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(5), pp.859–68.

Schmechel, D., Marangos, P.J. & Brightman, M., 1978. Neurone-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells. *Nature*, 276(5690), pp.834–6.

Schuel, H. et al., 2002. Evidence that anandamide-signaling regulates human sperm functions required for fertilization. *Molecular reproduction and development*, 63(3), pp.376–87.

Segal, N.H. et al., 1994. BCL-2 proto-oncogene expression in prostate cancer and its relationship to the prostatic neuroendocrine cell. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 118(6), pp.616–8.

Shackelford, D.B. & Shaw, R.J., 2009. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nature reviews. Cancer*, 9(8), pp.563–75.

Shariat, S.F. et al., 2001. Plasma levels of interleukin-6 and its soluble receptor are associated with prostate cancer progression and metastasis. *Urology*, 58(6), pp.1008–15.

Sharma, C. et al., 2015. Small Molecules from Nature Targeting G-Protein Coupled Cannabinoid Receptors: Potential Leads for Drug Discovery and Development. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015.

Shen, C.-H. et al., 2013. Phosphorylation of BRAF by AMPK Impairs BRAF-KSR1 Association and Cell Proliferation. *Molecular Cell*, 52(2), pp.161–172.

Shen, M. & Abate-Shen, C., 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development*, (212), pp.1967–2000.

Shen, R. et al., 1997. Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urologic Oncology*, 3(2), pp.67–75.

Siegsmond, M.J., Yamazaki, H. & Pastan, I., 1994. Interleukin 6 receptor mRNA in prostate carcinomas and benign prostate hyperplasia. *The Journal of urology*, 151(5), pp.1396–9.

Simonsen, A. & Tooze, S.A., 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *The Journal of cell biology*, 186(6), pp.773–82.

Sobin, L.H. & Compton, C.C., 2010. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*, 116(22), pp.5336–9.

Sparks, C.A. & Guertin, D.A., 2010. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene*, 29(26), pp.3733–44.

Steinberg, G.R., 2009. Role of the AMP-activated protein kinase in regulating fatty acid metabolism during exercise. *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiolog*, 34(3), pp.315–22.

Sun, Y., Niu, J. & Huang, J., 2009. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *American Journal of Translational Research*, 1(2), pp.148–162.

Suter, M. et al., 2006. Dissecting the role of 5'-AMP for allosteric stimulation, activation, and deactivation of AMP-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 281(43), pp.32207–16.

Tai, S. et al., 2012. Combination of Rad001 (everolimus) and propachlor synergistically induces apoptosis through enhanced autophagy in prostate cancer cells. *Molecular cancer therapeutics*, 11(6), pp.1320–31.

Tai, S. et al., 2011. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), pp.1668–79.

Takahashi, Y. et al., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nature cell biology*, 9(10), pp.1142–51.

Takahashi, Y. et al., 2011. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*, 7(1), pp.61–73.

Tan, C.-P. et al., 2014. Metallomics insights into the programmed cell death induced by metal-based anticancer compounds. *Metallomics: integrated biometal science*, 6(5), pp.978–95.

Tanaka, Y. et al., 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406(6798), pp.902–6.

Tang, Y. et al., 2009. The relationship of neuroendocrine carcinomas to anti-tumor therapies in TRAMP mice. *The Prostate*, 69(16), pp.1763–73.

Taylor, R.A., Toivanen, R. & Risbridger, G.P., 2010. Stem cells in prostate cancer: Treating the root of the problem. *Endocrine-Related Cancer*, 17(4).

Tennakoon, J.B. et al., 2015. *HHS Public Access*. , 33(45), pp.5251–5261.

Terry, S. et al., 2009. Increased expression of class III beta-tubulin in castration-resistant human prostate cancer. *British journal of cancer*, 101(6), pp.951–6.

Thorpe, L. et al., 2015. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. *Nature reviews. Cancer*, 15(1), pp.7–24.

Todde, V., Veenhuis, M. & van der Klei, I.J., 2009. Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(1), pp.3–13.

Tokanovic, S., Malone, D.T. & Ventura, S., 2007. Stimulation of epithelial CB1 receptors inhibits contractions of the rat prostate gland. *British journal of pharmacology*, 150(2), pp.227–34.

Tomlins, S.A. et al., 2007. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature genetics*, 39(1), pp.41–51.

Tong, W.-H. et al., 2011. The glycolytic shift in fumarate-hydratase-deficient kidney cancer lowers AMPK levels, increases anabolic propensities and lowers cellular iron levels. *Cancer cell*, 20(3), pp.315–27.

Towler, M.C. & Hardie, D.G., 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circulation research*, 100(3), pp.328–41.

Turu, G. & Hunyady, L., 2010. Signal transduction of the CB1 cannabinoid receptor. *Journal of molecular endocrinology*, 44(2), pp.75–85.

Vara, D. et al., 2011. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell death and differentiation*, 18(7), pp.1099–111.

Vashchenko, N. & Abrahamsson, P.-A., 2005. Neuroendocrine Differentiation in Prostate Cancer: Implications for New Treatment Modalities. *European Urology*, 47(2), pp.147–155.

Vanhaesebroeck B. et al., 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nature molecular cell biology*, 13(3), pp. 195-203.

Velasco, G. et al., 2016. The use of cannabinoids as anticancer agents. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 64, pp.259–266.

Vellai, T. et al., 2009. The regulation of aging: does autophagy underlie longevity? *Trends in cell biology*, 19(10), pp.487–94.

Vlotides, G. et al., Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells in vitro. *Hormones (Athens, Greece)*, 13(4), pp.498–508.

Weaver, E.M. et al., 2015. Posttranscriptional regulation of T-type Ca²⁺ channel expression by interleukin-6 in prostate cancer cells. *Cytokine*, 76(2), pp.309–320.

Wei, J., Calhoun, E. & Jacobsen, S., 2005. Urologic diseases in america project: benign prostatic hyperplasia. *The Journal of Urology*, 173(4), pp.1256–1261.

Wilson, R.I. & Nicoll, R.A., 2002. Endocannabinoid signaling in the brain. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5568), pp.678–82.

Wirawan, E. et al., 2012. Autophagy: for better or for worse. *Cell research*, 22(1), pp.43–61.

Woods, A. et al., 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell metabolism*, 2(1), pp.21–33.

Wright, M.E., Tsai, M.-J. & Aebbersold, R., 2003. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 17(9), pp.1726–1737.

Wu, C. & Huang, J., 2007. Phosphatidylinositol 3-kinase-AKT-mammalian target of rapamycin pathway is essential for neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6), pp.3571–3583.

Wu, Z. et al., 2010. Autophagy Blockade Sensitizes Prostate Cancer Cells towards Src Family Kinase Inhibitors. *Genes & cancer*, 1(1), pp.40–9.

Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), pp.471–84.

Wurmser, A.E. & Emr, S.D., 2002. Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *The Journal of cell biology*, 158(4), pp.761–72.

Wyatt, A.W. et al., 2016. Genomic Alterations in Cell-Free DNA and Enzalutamide Resistance in Castration-Resistant Prostate Cancer. *JAMA oncology*. Xiao, B. et al., 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 449(7161), pp.496–500.

Xiao, B. et al., 2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature*, 472(7342), pp.230–3.

Xie, S. et al., 2004. Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. *The Prostate*, 60(1), pp.61–7.

Xie, Z. & Klionsky, D.J., 2007. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nature cell biology*, 9(10), pp.1102–9.

Xing, N. et al., 2001. Neuroendocrine cells in human prostate over-express the anti-apoptosis protein survivin. *The Prostate*, 48(1), pp.7–15.

Xue, Y. et al., 1997. Prostatic neuroendocrine cells have a unique keratin expression pattern and do not express Bcl-2: cell kinetic features of neuroendocrine cells in the human prostate. *The American journal of pathology*, 151(6), pp.1759–65.

Yang, Z. & Klionsky, D.J., 2010. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology*, 22(2), pp.124–31.

Ylä-Anttila, P. et al., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5(8), pp.1180–5.

Yoshioka K, et al., 2012. Endothelial PI3K-C2alpha, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature Medicine*.; 18(10) pp.1560–9

Yu, L. et al., 2012. DAB2IP regulates autophagy in prostate cancer in response to combined treatment of radiation and a DNA-PKcs inhibitor. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 14(12), pp.1203–12.

Yuan, T.-C. et al., 2006. Androgen deprivation induces human prostate epithelial neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP cells. *Endocrine-related cancer*, 13(1), pp.151–67.

Yuan, T.C., Veeramani, S. & Lin, M.F., 2007. Neuroendocrine-like prostate cancer cells: Neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells. *Endocrine-Related Cancer*, 14(3), pp.531–547.

Yue, Z. et al., 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(25), pp.15077–82.

Zadra, G. et al., 2010. New strategies in prostate cancer: targeting lipogenic pathways and the energy sensor AMPK. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16(13), pp.3322–8.

Zadra, G., Batista, J.L. & Loda, M., 2015. Dissecting the Dual Role of AMPK in Cancer: From Experimental to Human Studies. *Molecular cancer research*, 13(7), pp.1059–72.

Zelivianski, S. et al., 2001. Multipathways for transdifferentiation of human prostate cancer cells into neuroendocrine-like phenotype. *Biochimica et biophysica acta*, 1539(1-2), pp.28–43.

Zhang, X.Q. et al., 2003. Receptor protein tyrosine phosphatase alpha signaling is involved in androgen depletion-induced neuroendocrine differentiation of androgen-sensitive LNCaP human prostate cancer cells. *Oncogene*, 22(43), pp.6704–16.

Zhang, C. Jiang B., Li M., et al., 2014. The lysosomal v-ATPase-Ragulator complex is a common activator for AMPK and mTORC1, acting as a switch between catabolism and anabolism. *Cell Metab*, 20(3):526-40.

Zhu, Y. et al., 2014. Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *The Prostate*, 74(11), pp.1086–94. Ziparo, E. et al., 2013. Autophagy in prostate cancer and androgen suppression therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(6), pp.12090–12106.

ANEXO I: SUMMARY

INTRODUCTION

Most prostate tumours appear as adenocarcinoma form whose development and progression are androgen-dependent. Therefore, conventional therapy focuses on blocking the synthesis of endogenous androgens and/or inhibiting the function of the androgen receptor. Androgen deprivation therapy rarely eliminates all the tumour cells and, with time, patients develop resistance to this treatment and, consequently prostate cancer resistant to castration (CRPC) occurs. In some cases, these types of cancer evolve into a very aggressive subtype with neuroendocrine differentiation (NED) whose survival rate might reach approximately one year. The comprehensive knowledge of the molecular mechanisms that underly the appearance of neuroendocrine cells and overall the determination of the processes that allow their survival and their biology, is of utmost importance in order to develop new therapeutic strategies that enable to treatment of this highly lethal cancer. It has been demonstrated that prostate cancer cells express high levels of the cannabinoid receptors CB1 and CB2. Activation of the CB2 receptor by JWH-015 cannabinoid induces cell cycle arrest and apoptosis (Ruiz-Llorente et al. 2003; Nithipatikom et al. 2004; Olea-Herrero et al. 2009a). However, it is unknown whether cannabinoid receptors exert any influence on the molecular mechanisms associated to neuroendocrine differentiation and the possible effect of WIN 55,212-2 (WIN) cannabinoid, a non-selective agonist of CB1 and CB2.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Neuroendocrine differentiation of prostate cancer LNCaP cells was induced by serum deprivation for 6 days. The levels of NE markers and signaling proteins were determined by Western blotting and qPCR.

The levels of IL-6 secreted by LNCaP and NE cells were measured by ELISA and the levels of cannabinoid receptors were determined by qPCR. The effect of WIN55, 212-2 on prostate cancer cell viability was analyzed by the MTT cell viability assay. The involvement of signaling cascades was investigated by pharmacological inhibition and siRNA.

The *in vivo* antitumor activity of WIN 55,212-2 was studied in athymic nude mice (nu/nu) which were injected subcutaneously in the right flank with 5×10^6 PC-3 cells, a mix of PC-3 and LNCaP cells, or a mix of PC-3 and NE cells in 0.1 ml of PBS + 0.5% BSA to induce prostate cell tumors. Tumor size was measured daily and calculated using the formula $V(\text{mm}^3) = 1/2(\text{Length} \times \text{Width}^2)$. When tumors reached a volume of 100 mm^3 (approximately two weeks after transplantation), the mice were randomly divided into 2 groups (n =4) and treated daily s.c. with vehicle, 0.5 mg/kg WIN 55,212-2 (PC-3) or 1,5mg/Kg WIN 55,212-2 for 15 days. At the end of the study, the mice were sacrificed by placing them in a CO₂ gas-filled chamber, and the excised tumors were

recovered and homogenized in lysis buffer for protein quantification and Western blotting.

All experiments were executed at least 3 times and performed by triplicate. The statistical significance of differences between the means was evaluated using the unpaired student's t test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$. Data are presented as the mean \pm S. E of the number of experiments indicated. Calculations were performed using Instat (Graphpad Software).

RESULTS AND CONCLUSIONS

The differentiated LNCaP cells exhibited neurite outgrowth and increased expression of the typical neuroendocrine (NE) markers neuron-specific enolase (NSE) and β III-tubulin (β III Tub). In accordance with previous reports showing a reduced expression and /or activity of AR (Wright et al. 2003), NE cells showed decreased AR and PSA expression besides to increased levels of NE markers. In addition, and according to previous reports (Cox et al. 1999), we corroborated that the neuroendocrine phenotype of LNCaP cells is reversible since the levels of the NE markers rise when SF medium is replaced with a complete medium and cells are maintained in culture for an additional 6 days.

NE cells showed increased levels of the IL-6 secreted. Treatment with 3 μ M WIN diminished this secretion. The incubation of PC-3 cells with supernatant obtained from NE cells with IL-6 knocked down did not cause any effect on PC-3 cell viability.

The presence of NE cells increased the mitogenic capacity of PC-3 cells, which is not mediated by the secretion of IL-6 from NE cells. The presence of NE cells stimulate the growth of tumor PC-3 cells.

The PI3K/Akt/mTOR pathway in the neuroendocrine differentiation of LNCaP cells was hyper-activated as deduced by the significantly increased levels of phosphorylated Akt in Ser473, compared to control LNCaP cells. The treatment of cells either with the PI3K inhibitor LY294002, the Akt selective inhibitor Inhibitor IV (Akt Inh IV) or the mTOR inhibitor rapamycin, resulted in a decrease of the neuroendocrine markers NSE and β III tubulin expression in NE cells.

To analyze the role of AMPK in the NE differentiation of prostate LNCaP cells, cells were serum-deprived for 6 days and phosphorylation levels of AMPK in Thr172 and its well-established substrate acetyl-coenzyme A carboxylase (ACC) were monitored by Western blot. The results show that during neuroendocrine differentiation, there is a decrease in Thr172 phosphorylation of AMPK and in Ser79 of ACC, which indicates an inhibition of the AMPK pathway. To further analyze the function of AMPK on NED, LNCaP cells were treated with the AMPK pharmacological activator AICAR. This treatment rescued the decrease of ACC expression observed in NE cells, confirming that AMPK regulates its expression and notably reduces the expression of the NED markers NSE and β III Tub. Our findings also demonstrate, for the first time, that AMPK is inhibited in NE differentiation of prostate cells. This work demonstrates that Akt

activation is involved in the AMPK inactivation and this AMPK inhibition contributes to NE differentiation.

To explore the status of autophagy in NE cells, the protein levels of LC3, p62, Atg1, Atg5 and LAMP2 were measured. The results show that autophagy is activated in neuroendocrine differentiated LNCaP cells. Long-term cell treatments with different pharmacological inhibitors of PI3K used to block autophagy (3-MA and LY294002) or Atg5 knockdown significantly blocked autophagy and prevented neuroendocrine differentiation of LNCaP cells, suggesting an essential role of autophagy activity in NE differentiation of LNCaP cells. Silencing of LAMP2 in NE cells significantly decreased the levels of the neuroendocrine marker β III Tub but not those of NSE, resulting in an accumulation of the cargo protein p62 in both control and NE cells, indicating that knock down of LAMP2 blocks the fusion of autophagosomes and lysosomes. To investigate the effect of the pharmacological inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway or pharmacological activation of AMPK on autophagy during NED, LNCaP cells were treated for 6 days with LY294002, Akt Inh IV, rapamycin or AICAR, respectively. All of these treatments produced the same blocking effect on autophagy. Taken together, these results demonstrate that pharmacological inhibition of PI3K activity abrogates autophagy flux and NE differentiation in LNCaP cells, suggesting an essential role of autophagy activity in NE differentiation of LNCaP cells.

Our results also show that during NE differentiation, the expression of the cannabinoid receptors CB1 and CB2 dramatically decreases. Treatment with 3 μ M WIN 55,212-2 (a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) during 6 days inhibited neuroendocrine differentiation of LNCaP and PC-3 cells. In order to gain insight into the mechanism whereby the cannabinoid WIN prevents neuroendocrine differentiation of prostate LNCaP cells, we analyzed the PI3K/Akt/mTOR pathway. Addition of 3 μ M WIN during serum deprivation markedly reduced the increase in phosphorylated Akt in NE cells, implying a WIN-induced blocking of the PI3K/Akt pathway. When 3 μ M WIN was added to the serum-deprived medium, the inhibition of AMPK observed in NE cells, was prevented. Our results show an inhibition of this pathway by the cannabinoid WIN, indicating that WIN is probably acting at the beginning of the process and that this cannabinoid may be useful for the treatment of neuroendocrine cancers. In perspective, cannabinoids could represent a viable strategy to prevent or delay the progression of advanced prostate cancer with neuroendocrine differentiation features.

ANEXO II: PUBLICACIONES

ORIGINAL ARTICLE

The cannabinoid WIN 55,212-2 prevents neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells

C Morell¹, A Bort¹, D Vara², A Ramos-Torres¹, N Rodríguez-Henche¹ and I Díaz-Laviada¹

BACKGROUND: Neuroendocrine (NE) differentiation represents a common feature of prostate cancer and is associated with accelerated disease progression and poor clinical outcome. Nowadays, there is no treatment for this aggressive form of prostate cancer. The aim of this study was to determine the influence of the cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN, a non-selective cannabinoid CB1 and CB2 receptor agonist) on the NE differentiation of prostate cancer cells.

METHODS: NE differentiation of prostate cancer LNCaP cells was induced by serum deprivation or by incubation with interleukin-6, for 6 days. Levels of NE markers and signaling proteins were determined by western blotting. Levels of cannabinoid receptors were determined by quantitative PCR. The involvement of signaling cascades was investigated by pharmacological inhibition and small interfering RNA.

RESULTS: The differentiated LNCaP cells exhibited neurite outgrowth, and increased the expression of the typical NE markers neuron-specific enolase and β III tubulin (β III Tub). Treatment with 3 μ M WIN inhibited NE differentiation of LNCaP cells. The cannabinoid WIN downregulated the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, resulting in NE differentiation inhibition. In addition, an activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) was observed in WIN-treated cells, which correlated with a decrease in the NE markers expression. Our results also show that during NE differentiation the expression of cannabinoid receptors CB1 and CB2 dramatically decreases.

CONCLUSIONS: Taken together, we demonstrate that PI3K/Akt/AMPK might be an important axis modulating NE differentiation of prostate cancer that is blocked by the cannabinoid WIN, pointing to a therapeutic potential of cannabinoids against NE prostate cancer.

Prostate Cancer and Prostatic Diseases (2016) **19**, 248–257; doi:10.1038/pcan.2016.19; published online 21 June 2016

INTRODUCTION

Prostate cancer is one of the most common prevalent cancer among men worldwide and the second cause of cancer-induced deaths in western countries.¹

A distinctive feature of prostate cancer is the occasional appearance within the prostate tumor mass of a large number of single or clustered neuroendocrine (NE) cells, a situation called NE prostate cancer. NE cells secrete neuropeptides that induce mitogenic effects on prostate cancer cells.² The NE cells are defined immunohistochemically by the presence of cytoplasmic markers, such as, chromogranin A, neuron-specific tubulin 3 (β III tubulin) and neuron-specific enolase (NSE).³ NE prostate cancers become rapidly growing and highly aggressive,⁴ as NE cells might contribute to the regrowth of prostate cancer cells that have adapted to the hormone-deprived environment or the absence of androgen receptor stimulation.⁵ In fact, NE prostate cancer usually occurs as a recurrent tumor in men who have received hormonal therapy for prostatic adenocarcinoma, and its presence correlates with tumor progression and poor prognosis.^{6,7}

The origin of NE cells in prostate cancer is under discussion. It is thought that NE-like cells come from a 'epithelial-to-neuroendocrine' transition process of prostate cancer cells, known as NE differentiation, as they differ in some aspects from NE cells present in the normal prostate. NE differentiation is a well-recognized phenotypic change by which prostate cancer

cells transdifferentiate into NE-like cells. Nevertheless, the mechanism underlying NE differentiation remains still unclear, and the management of patients with NE prostate cancer is a challenge for oncologists. Therefore, novel therapies are needed for this clinically significant and defiant variant of prostate cancer.⁸

Over the last decade, several research groups including ours have proposed that cannabinoid receptor agonists exert a direct antitumor activity in a variety of aggressive cancers. In prostate cancer cells, natural and synthetic cannabinoids have been shown to inhibit cell growth in culture and in experimental animal models.^{9–11} Numerous investigations demonstrate the ability of cannabinoids to inhibit prostate cancer cells' viability/proliferation, as well as invasion and metastasis.^{12,13} The expression of cannabinoid receptors in prostate cancer cells is higher than that in corresponding non-malignant tissues,¹⁴ and also the enzymes responsible for cannabinoid degradation, suggesting that the endocannabinoid system has a role in prostate growth.^{10,15} Two cannabinoid receptors, CB1 and CB2, have been identified to date and belong to a Gi/o family of receptors presenting seven transmembrane domains.^{16,17} The mechanisms by which activation of cannabinoid receptors affect prostate cancer cell survival are quite diverse and a matter of current research. Moreover, receptor-independent effects also mediate

¹Department of System Biology, Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine, Alcalá University, Madrid, Spain and ²Division of Cell Signalling and Immunology, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK. Correspondence: Professor I Díaz-Laviada, Department of System Biology, Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine, Alcalá University, Ctra A-2, Km 32, Madrid 28771, Spain. E-mail: Ines.diazlaviada@uah.es

Received 1 February 2016; revised 10 April 2016; accepted 2 May 2016; published online 21 June 2016

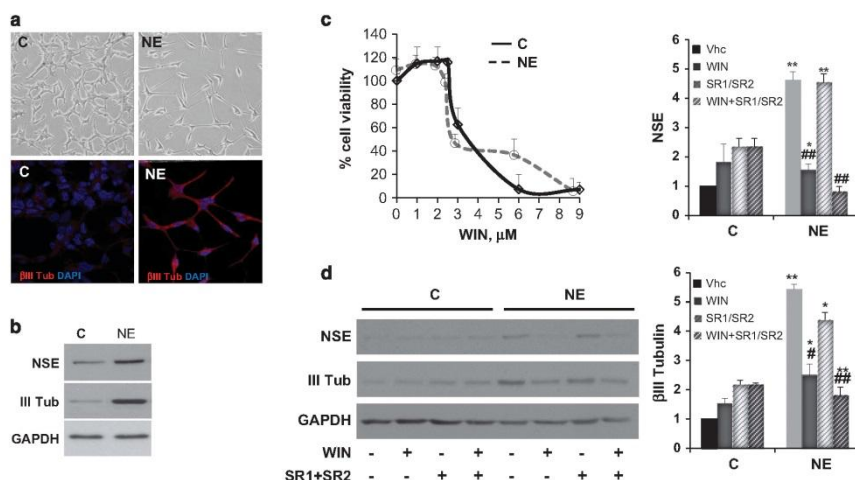


Figure 1. The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) inhibits NE differentiation of LNCaP cells. (a) NE differentiation cells was induced by serum deprivation of LNCaP for 6 days. Cell morphology of control LNCaP cells (control, C) and serum-deprived cells (NE cells) was monitored by phase-contrast microscopy (upper panel) and immunofluorescence of class III β Tubulin (β III Tub, red) counterstained with DAPI (blue) (lower panel). (b) Expression of the NE markers neuron-specific enolase (NSE) and β III Tub in control and NE cells. GAPDH was probed as a loading control. (c) LNCaP control cells (C) and NE cells were incubated with increasing concentrations of WIN for 48 h and cell viability was monitored by MTT. (d) LNCaP control cells and NE cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μ M of WIN (WIN) or 1 μ M of the CB1 inverse agonist SR1 and 1 μ M of the CB2 inverse agonist SR2 (SR1/SR2) for 6 days. Levels of the NSE and β III Tub were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other four experiments. Densitometric analysis of the western blot bands is shown on the right. The data shown are the means \pm s.d. of four different experiments (* P < 0.05 and ** P < 0.01 versus control cells, # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus NE, compared by the Student's *t*-test). NE, neuroendocrine.

many of the antiproliferative actions of cannabinoid ligands on prostate tumor cells.¹⁸

Herein, we explored the potential role of the synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) on serum deprivation-induced NE differentiation of prostate LNCaP cells.

MATERIALS AND METHODS

Materials

The cannabinoid WIN 55-212,2 (WIN) was purchased at Sigma (St Louis, MO, USA). The CB1 antagonist SR-141716 and the CB2 antagonist SR-144528 were kindly provided from Sanofi-Synthelabo (Montpellier, France). The anti-p-S6, p-p70S6K, p-AKT-ser473, p-mTOR, p-AMPK α 1-thr172, p-ACC-ser79 and the antibodies against the corresponding total forms were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The anti- β III Tub polyclonal antibody was obtained from Covance (Princeton, NJ, USA). The anti-NSE monoclonal antibody was obtained from Dako (Glostrup, Denmark). Recombinant human interleukin-6 (IL-6) was purchased at Preprotech (New York, NY, USA) All the other chemicals were obtained from Sigma.

Cell culture

Human prostate epithelial LNCaP (ATCC CRL-1740) and PC-3 (ATCC CRL-1435) cells were purchased frozen from American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). All the experiments were performed with cells at passages 3–15. Cells were routinely grown in RPMI 1640 medium supplemented with 100 IU ml⁻¹ penicillin G sodium, 100 μ g ml⁻¹ streptomycin sulfate, 0.25 μ g ml⁻¹ amphotericin B (Invitrogen, Paisley, UK) and 10% fetal calf serum. For androgen deprivation-induced NE differentiation, the medium was replaced for serum-free RPMI 1640 and then incubated for 6 days. For NE differentiation induced by long

treatment with IL-6, 20 ng ml⁻¹ of human recombinant IL-6 was added to the medium and the cells were incubated for 6 days.

Immunofluorescence staining

Cells were plated on glass coverslips and immunofluorescence was performed as previously described.¹⁹

Proliferation assay

Cells were seeded in a 12-well plate at 5000 cells per well, maintained for 24 h and then treated with increasing concentrations of WIN with or without 10% fetal bovine serum for 6 days, according to the experiment. MTT cell viability assay was performed as previously described.²⁰

Immunoblotting assay

LNCaP cells were washed with phosphate-buffered saline and lysed in a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.8 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) containing Protease Inhibitor and Phosphatase inhibitor Cocktails (Roche, Basel, Switzerland), and cleared by microcentrifugation. Western blotting was performed as previously described.¹⁹

Real-time quantitative PCR

Complementary DNA was obtained from cells using Transcriptor (Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA). Real-time quantitative PCR assays were performed using the FastStart Universal Probe Master mix with Rox (Roche Applied Science), and probes were obtained from the Universal ProbeLibrary Set (Roche Applied Science); CB1 sense primer 5'-CATTAGACGGTGTTCGATTCT-3'; CB1 antisense primer 5'-CGTGTCGACGGTCC TTACTC-3'; CB2 sense primer 5'-GACACGGACCCCTTTTGCT-3'; CB2 antisense primer 5'-CCTCGTGGCCCTACCTATCC-3' or from Ambion (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Amplifications were run in a 7900

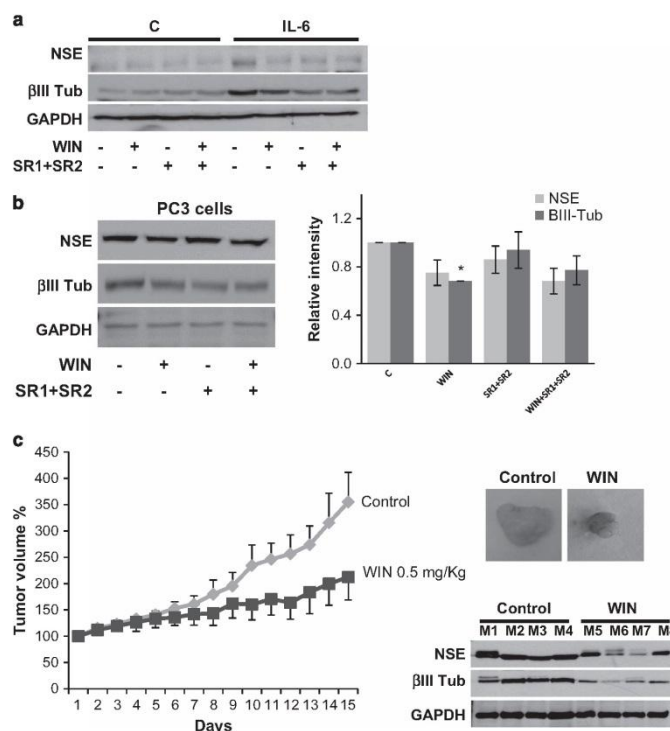


Figure 2. Inhibition of NE differentiation by WIN 55,212-2 (WIN) in IL-6 long treated LNCaP cells and in PC-3 cells. **(a)** NE differentiation of LNCaP cells was induced by incubation with IL-6 (20 ng ml⁻¹)-supplemented medium for 6 days. Cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μM of WIN (WIN) or 1 μM of the CB1 inverse agonist SR1 and 1 μM of the CB2 inverse agonist SR2 (SR1/SR2) for 6 days. Levels of the NE markers neuron-specific enolase (NSE) and βIII tubulin (βIII Tub) were determined by western blot. **(b)** NE markers NSE and βIII Tub in PC-3 cells treated as above. The image is representative of other three experiments. GAPDH was probed as a loading control. Densitometric analysis of the western blot bands is shown on the right. The data shown are the means ± s.d. of three different experiments (**P* < 0.05 versus control cells, compared by the Student's *t*-test). **(c)** Effect of WIN on PC-3 growth and βIII Tub expression *in vivo*. PC-3 xenografts were generated by subcutaneously injection in athymic mice (*n* = 8). When tumors reached 100 mm³ volume, mice were randomly divided into two groups and treated with 0.5 mg kg⁻¹ WIN or vehicle. Graph represents tumor growth from the first day of treatment and results are expressed as the mean ± s.e.m. of the size of the tumor. A representative image of the tumor at the end of the treatment is shown on the right. Down, levels of βIII Tub in the dissected tumors. IL, interleukin; NE, neuroendocrine.

HT-Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Each value was adjusted by using 18S RNA levels as a reference.

Animal study

Eight male athymic nude-Foxn1 (nu/nu) mice aged 4 weeks were purchased from Envigo RMS (Barcelona, Spain), and housed under specific pathogen-free conditions in a 12-hour light-dark cycle at 21–23 °C and 40–60% humidity with access to food pellets and tap water *ad libitum*. All animal studies were conducted in accordance with the Spanish institutional regulation (Decree 53/2013) for the housing, care and use of experimental animals with the approval of the Institutional Animal Care and Use Committee of Alcalá University and by Comunidad de Madrid (PROEX 241/15). This study met the European Community directives regulating animal research. Recommendations made by the United Kingdom Coordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) have been kept carefully.

After 1-week adaptation period, mice were injected subcutaneously in the right flank with 5 × 10⁶ PC-3 cells in 0.1 ml of phosphate-buffered

saline+0.5% BSA to induce prostate cell tumors. Tumor sizes were measured everyday and calculated using the formula $V \text{ (mm}^3\text{)} = 1/2 \text{ (length} \times \text{width}^2\text{)}$. When tumors reached a volume of 100 mm³ (~2 weeks after transplantation), the mice were randomly divided into two groups (*n* = 4) and daily treated subcutaneously with vehicle, or 0.5 mg kg⁻¹ WIN 55,212-2 for 15 days. At the end of the study, the mice were killed by placing them in a CO₂ gas-filled chamber, and the excised tumors were recovered and homogenized in lysis buffer for protein quantification and western blotting.

Statistical analysis

All experiments were executed at least three times and performed in triplicate. The statistical significance of differences between the means was evaluated using the unpaired Student's *t*-test. The level of significance was set at *P* ≤ 0.05. Calculations were performed using Instat (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

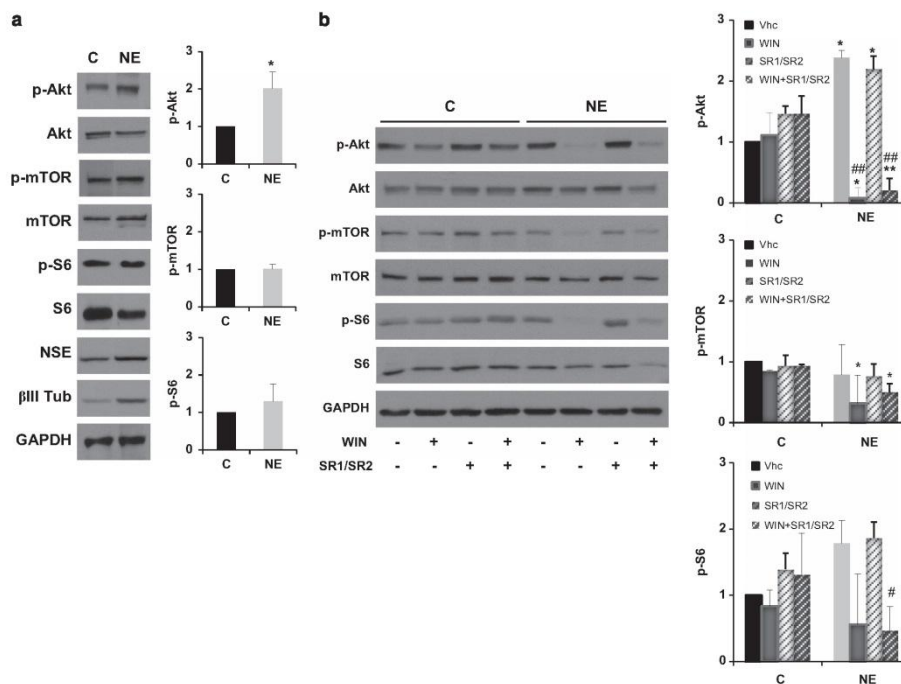


Figure 3. The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) blocks the PI3K/Akt/mTOR axis activation produced in NE differentiation of LNCaP cells. (a) Phosphorylation profile of key proteins of the PI3K/Akt pathway in LNCaP cells (control, C) and in NE cells (NE). Expression of neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III Tub) were monitored as a NE differentiation control. GAPDH was probed as a loading control. (b) LNCaP control and NE cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μ M of WIN, or 1 μ M of the CB1 inverse agonist SR1 and 1 μ M of the CB2 inverse agonist SR2 (SR1/SR2) for 6 days. Levels of the phosphorylated and total forms of Akt, mTOR and S6 proteins were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other three experiments. Densitometric analyses of the western blot bands are shown on the right of the WB. The data shown are the means \pm s.d. of three different experiments. (* P < 0.05 and ** P < 0.01 versus control cells, # P < 0.05 and ## P < 0.01 versus NE cells, compared by the Student's *t*-test). NE, neuroendocrine.

RESULTS

The synthetic cannabinoid receptor ligand WIN prevents NE differentiation induced by serum-deprivation of prostate LNCaP cells

Different cell models have been used for understanding the molecular mechanisms of NE differentiation. The most widely used is the experimental manipulation of the androgen-sensitive prostate cancer cell line LNCaP to induce a transition into a NE phenotype. This phenotypic switch has been seen especially when cells are grown in hormone-depleted medium.²¹ In order to mimic the situation of androgen removal, prostate LNCaP cells were incubated in the absence of serum for 6 days. Cells grown in the absence of serum stop division and stay quiescent (Supplementary Figure 1). As seen in Figure 1a, serum deprivation of LNCaP cells for 6 days induced a NE-like phenotype corroborated by the appearance of many features of NE cells, like neurite outgrowth (cell body prolongation longer than twice the cell body diameter), and the expression of the highly specific markers for NE cells class III β tubulin (β III-Tub). The expression of β III-Tub as well as the dominant enolase-isoenzyme found in NE tissues, the NSE,²² were also determined by western blot (Figure 1b).

In order to study the effect of cannabinoids on prostate LNCaP cells' NE differentiation, we choose the non-selective CB1 and CB2 agonist WIN 55,212-2 (WIN). WIN is a synthetic cannabinoid that has been shown to act on both CB1 and CB2 and one of the most widely used analogs of endocannabinoids designed to activate cannabinoid receptors. In the LNCaP prostate cancer cell line, as well as in the NE differentiated cells, WIN dose-dependently decreased cell viability, with an overall IC_{50} value of 3 μ M (Figure 1c). We then used this dose to investigate whether the cannabinoid WIN had any effect on the neuroendocrine differentiation (NED) of LNCaP cells. As shown in Figure 1d, incubation of LNCaP cells with WIN notably and significantly reduced the NE markers NSE and β III Tub expressed by NE cells. In order to investigate the involvement of the cannabinoid receptors, we used the CB1 inverse agonist SR1 and the CB2 inverse agonist SR2. These compounds when added together did not modify the effect of WIN.

To reinforce the notion that the cannabinoid WIN abrogated NE differentiation of prostate LNCaP cells, we used another model of NE differentiation. As stated previously, NE differentiation of LNCaP cells can also be induced by long-treatment with IL-6.²³ We then incubated LNCaP cells with 20 ng ml⁻¹ of human recombinant IL-6 for 6 days in the presence or not of 3 mM WIN. IL-6-treated

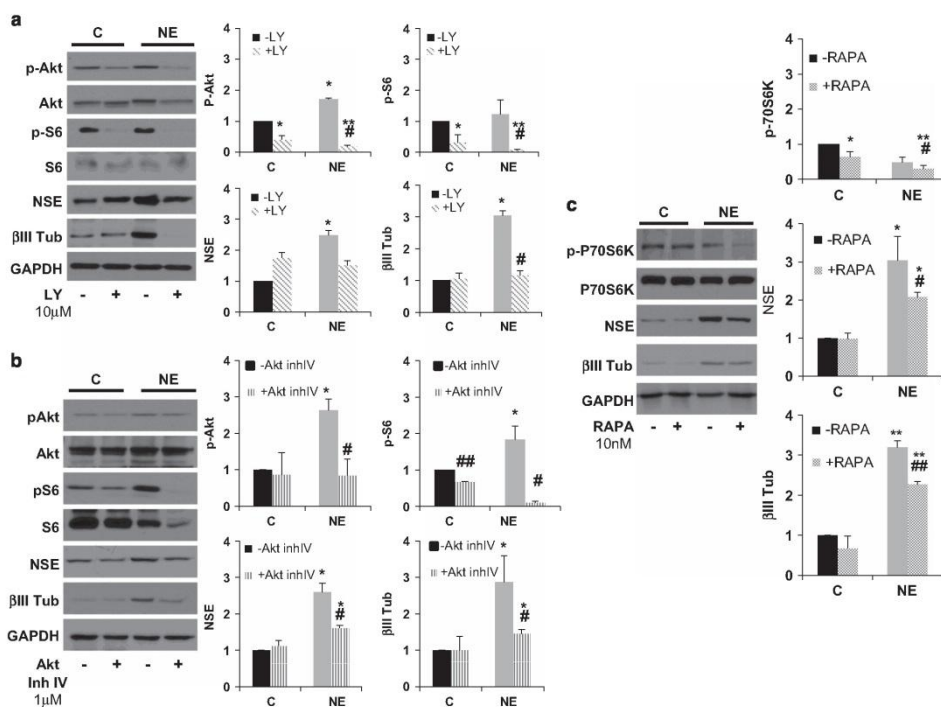


Figure 4. Pharmacological inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway prevents NE differentiation of LNCaP cells. LNCaP (Control, C) and NE cells were incubated either with the PI3K inhibitor LY 294002 (a) the Akt inhibitor Akt Inhibitor IV (b) or the mTOR inhibitor rapamycin (c) during serum-deprivation. Levels of phosphorylated and total forms of the signaling proteins as well as of the NE markers neuron-specific enolase (NSE) and βIII tubulin (βIII Tub) were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other four experiments. Densitometric analysis of the western blot bands are shown on the right. The data shown are the means \pm s.d. of four different experiments (* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus control cells, # $P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ versus NE cells, compared by the Student's *t*-test). NE, neuroendocrine.

cells displayed morphological characteristics of NE cells (not shown) and increased the expression of NSE and βIII Tub, confirming the acquisition of a NE phenotype (Figure 2a). When NE cells were treated with 3 nM WIN a downregulation of NSE and βIII Tub expression was observed (Figure 2a).

NE differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation or IL-6 treatment was reversible, and the cells turned back to control LNCaP when serum was replenished or IL-6 was removed (not shown). Therefore, to validate the inhibitory effect of WIN *in vivo*, we moved to PC-3 cells as they may be considered as a cell line characteristic of prostatic small cell NE carcinoma.²⁴ In fact, PC-3 cells express high levels of NE markers such as NSE, Chromogranin A and βIII Tub, and they do not express AR and PSA. Moreover, PC-3 cells, usually maintain NE characteristics along an *in vivo* experiment even in the presence of the animal serum. We first tested the effect of WIN on PC-3 cells *in vitro*. Cells were treated with 3 nM WIN for 6 days and levels of NSE and βIII Tub were determined. As shown in Figure 2b, the expression of both markers diminished after 6 days of WIN treatment. Next, PC-3 tumors were generated in male athymic nude mice and treated with 0.5 mg kg⁻¹ WIN for 15 days. WIN-treated PC-3 xenografts grew slower and the size of the tumors at the end of the experiment was

smaller compared with vehicle-treated PC3 xenografts (Figure 2b). Likewise, levels of βIII Tub decreased in WIN-treated tumors compared with non-treated tumors (Figure 2b).

The cannabinoid WIN inhibits the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in NE differentiated LNCaP cells

To investigate the role of the PI3K/Akt/mTOR pathway in the NE differentiation of the prostate cancer cell line LNCaP, cells were deprived of serum for 6 days and phosphorylation levels of Akt and its downstream signaling proteins mTOR and S6 were determined by western blotting. Consistent with previous observations,^{25,26} the PI3K/Akt signaling pathway was hyper-activated as deduced by the significantly increased levels of phosphorylated Akt in Ser473, compared with control LNCaP cells (Figure 3a). Levels of phosphorylated downstream signaling proteins, mTOR and S6, although not significantly, were also increased.

In order to gain insight into the mechanism whereby the cannabinoid WIN prevented NE differentiation of prostate LNCaP cells, we analyzed the PI3K/Akt/mTOR pathway. Addition of 3 μM WIN during serum deprivation, markedly reduced the increase in phosphorylated Akt, phosphorylated mTOR and phosphorylated

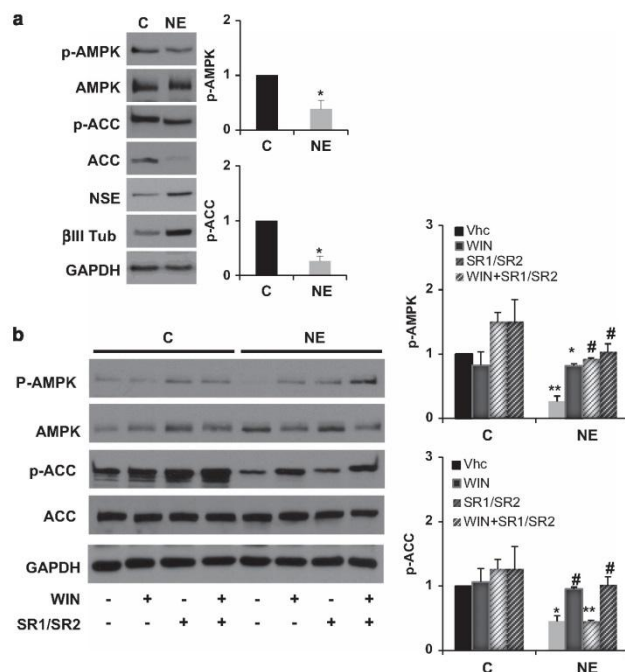


Figure 5. The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 (WIN) prevents AMPK inhibition produced in NE differentiation of LNCaP cells. **(a)** LNCaP cells were serum-deprived for 6 days and levels of phosphorylated and total forms of AMPK and acetyl CoA carboxylase (ACC), as well as of the NE markers neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III Tub) were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. Densitometric analysis of the western blot bands are shown on the right. The data shown are the means \pm s.d. of four different experiments ($^*P < 0.05$ versus control cells compared by The Student's *t*-test). **(b)** LNCaP control and NE cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μ M of WIN 55-212,2 (WIN), 1 μ M of the cannabinoid receptor inverse agonists SR1 and SR2 (SR1/SR2) or combined together for 6 days. Levels of the phosphorylated and total forms of AMPK and ACC proteins were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other four experiments. Densitometric analysis of the western blot bands are shown on the right. The data shown are the means \pm s.d. of three different experiments. ($^*P < 0.05$ and $^{**}P < 0.01$ versus control cells, $^{\#}P < 0.05$ and $^{\#\#}P < 0.01$ versus NE cells, compared by the Student's *t*-test). ACC, acetyl CoA carboxylase; AMPK, AMP-activated protein kinase; NE, neuroendocrine.

S6 produced in NE cells, implying a WIN-induced blocking of the PI3K/Akt pathway (Figure 3b). It is worthy to note that in these conditions, WIN did not have any effect on PI3K/Akt/mTOR axis in control cells (Figure 3b).

We then compared the effect of WIN with that produced by the widely used PI3K/Akt/mTOR signaling cascade inhibitors. Treatment of cells either with the PI3K inhibitor LY 294002, the Akt selective inhibitor Inhibitor IV (Inh IV) or the mTOR inhibitor rapamycin, resulted in a decrease of the NE markers NSE and β III Tubulin expression in serum-deprived cells (Figure 4). These results were comparable to those produced by WIN (Figure 3b). Interestingly, whereas LY and Akt Inh IV almost totally blocked NSE and β III Tubulin expression, the mTOR inhibitor rapamycin, had a lesser effect. This result indicates that Akt may regulate the differentiation process by other mTOR-independent mechanisms.

The cannabinoid WIN inhibits NE differentiation by activation of AMPK

In addition to its energy sensor function, the AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling system has recently emerged as a

modulator of cell proliferation and survival.²⁷ Therefore, AMPK has been revealed as a novel target for anticancer therapy.²⁸ We then investigated the effect of WIN treatment on AMPK and the role of this kinase in NE differentiation. To investigate the role of AMPK in the NE differentiation of prostate LNCaP cells, cells were serum-deprived for 6 days and phosphorylation levels of AMPK in Thr172 and its well-established substrate acetyl coenzyme A carboxylase (ACC) were monitored by western blot. Figure 4a shows that during NE differentiation there is a decrease in Thr172 phosphorylation of AMPK and in ser 79 of ACC, which indicates an inhibition of the AMPK pathway. Interestingly, levels of total ACC decrease during NED, suggesting that AMPK is also regulating ACC expression. Levels of the NE markers NSE and β III Tub are shown as a NE differentiation control (Figure 5a).

When 3 μ M WIN was added to the serum-deprived medium, the inhibition of AMPK observed in NE cells was prevented. This effect was independent of cannabinoid receptors, as SR1 and SR2 when combined together did not modify the effect of WIN (Figure 5b).

To further analyze the function of AMPK on NE differentiation, LNCaP cells were treated with the AMPK pharmacological activator AICAR during the 6 days of serum deprivation. As shown

in Supplementary Figure 2, AICAR increased phosphorylation of ACC in both control and NE cells, indicating that AMPK is active. Moreover, AICAR treatment rescued the decrease of ACC expression observed in NE, confirming that AMPK regulates its

expression. Interestingly, as observed with the treatment with WIN, AMPK activation with AICAR notably reduced the expression of NED markers NSE and β III Tub (Supplementary Figure 2).

The effect of Win on the PI3K/Akt pathway and AMPK in NE cells was further corroborated in IL-6 long-term-treated LNCaP cells. As shown in Figure 6, in IL-6-induced NE differentiation, a decrease in p-AMPK and p-ACC is observed, which is in consonance with serum withdrawal-induced NE differentiation, suggesting that AMPK inhibition is a general phenomenon of NE differentiation. As was the case in NE differentiation induced by serum depletion, treatment with 3 nM WIN increased both p-AMPK and p-ACC in NE cells.

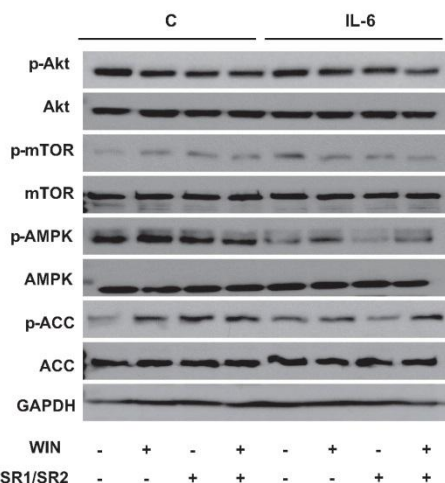


Figure 6. Effect of WIN 55,212-2 on IL-6-induced NE differentiation. NE differentiation of LNCaP cells was induced by incubation with IL-6 (20 ng ml⁻¹) -supplemented medium for 6 days. Cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μ M of WIN (WIN) or 1 μ M of the CB1 inverse agonist SR1 and 1 μ M of the CB2 inverse agonist SR2 (SR1/SR2) for 6 days. Levels of the phosphorylated and total forms of Akt, AMPK and acetyl CoA carboxylase (ACC) proteins were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other three experiments. IL, interleukin; NE, neuroendocrine.

Suppression of PI3K/Akt/mTOR pathway prevents AMPK inhibition and reduces NE differentiation

In order to establish a relationship between the two pathways studied, we determined the effect of PI3K/Akt/mTOR pathway inhibition on AMPK phosphorylation and activity. When cells were incubated either with the PI3K inhibitor LY 294002 or with the Akt inhibitor IV, the decrease of phosphorylated AMPK observed in NE cells was abrogated (Figure 7). This indicates that inhibition of PI3K or Akt prevents inhibition of AMPK and, therefore, the PI3K/Akt pathway modulates AMPK in NE cells. According to this idea, the NE differentiation-induced diminution in phosphorylated ACC was prevented in LY 294002 and inhibitor IV-treated cells (Figure 7). In these conditions, the NE markers NSE and β III Tubulin also decreased (Figure 7).

The cannabinoid receptors CB1 and CB2 expression decrease during NE differentiation of prostate LNCaP cells

We then sought to study whether WIN-induced inhibition of LNCaP differentiation was linked to CB1 or CB2. The cannabinoid receptors CB1 and CB2 are constitutive components of the endocannabinoid system and mediate many of the effects induced by cannabinoids. Although the effect of the cannabinoid receptor ligand WIN on signaling cascades of NE cells was not prevented by the cannabinoid receptors, inverse agonists SR1 and SR2, we decided to analyze the expression levels of both receptors. Quantitative PCR analyses showed that in NE cells there

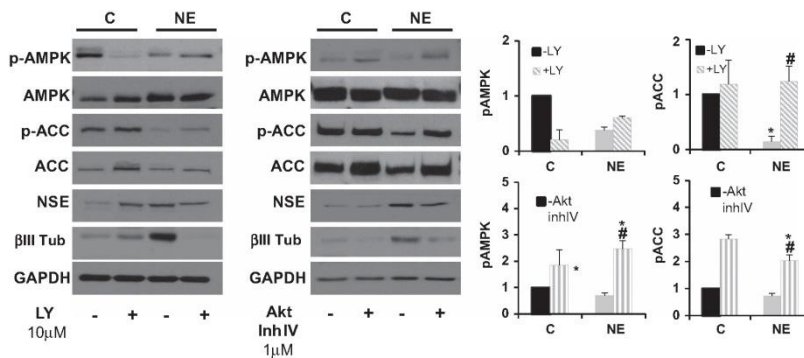


Figure 7. Suppression of PI3K/Akt activation prevents AMPK inhibition. LNCaP control and NE cells were treated with the PI3K inhibitor LY 294002 (LY) or the Akt inhibitor IV (Akt InhIV) for 6 days. Levels of phosphorylated and total forms of AMPK and acetyl CoA carboxylase (ACC), as well as of the NE markers neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III Tub) were determined by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other three experiments. Densitometric analysis of the western blot bands are shown on the right. The data shown are the means \pm s.d. of three different experiments (^{*}P < 0.05 versus non-treated cells and [#]P < 0.05 versus NE cells, compared by the Student's t-test). AMPK, AMP-activated protein kinase; NE, neuroendocrine.

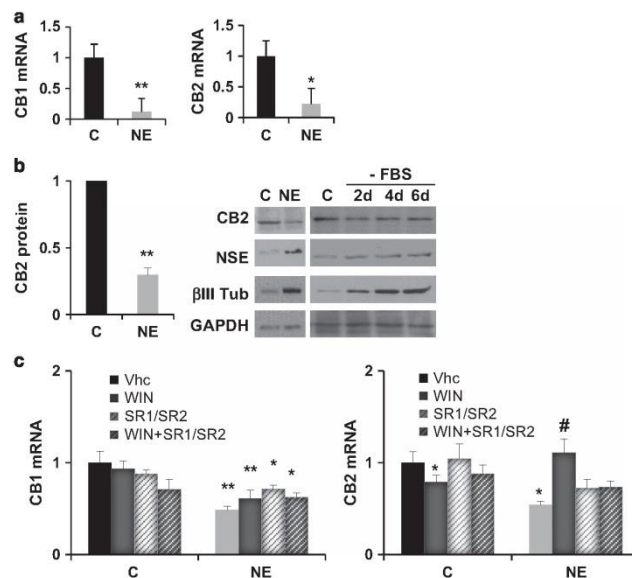


Figure 8. NE differentiation of LNCaP cells induces a decrease of cannabinoid receptors CB1 and CB2 expression. (a) Cannabinoid receptors CB1 and CB2 mRNAs levels in LNCaP control and NE cells analyzed by quantitative PCR according to the Materials and Methods section. (b) LNCaP cells were serum-deprived for 2, 4 and 6 days and levels of the cannabinoid receptor CB2 protein and NE markers neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III Tub) were analyzed by western blot. GAPDH was probed as a loading control. The image is representative of other three experiments. Densitometric analysis of the western blot bands of CB2 is shown on the left. (c) LNCaP control and NE cells were treated with vehicle (Vhc), 3 μ M of WIN 55-212,2 (WIN) 1 μ M of the cannabinoid receptor inverse agonists SR1 and SR2 (SR1/SR2) or combined together for 6 days. Levels of CB1 and CB2 mRNA were analyzed by quantitative PCR according to the Materials and Methods section. The data shown are the means \pm s.d. of three different experiments (* P < 0.05; ** P < 0.01 versus control cells and # P < 0.05 versus NE cells, compared by the Student's *t*-test). NE, neuroendocrine.

was a dramatic decrease in CB1 and CB2 expression (Figure 8a). Immunoblotting revealed that serum withdrawal reduced the expression of CB2 protein in a time-dependent manner (Figure 8b). Then we treated cells with 3 μ M WIN during serum deprivation and found that NE cells treated with WIN not only preserved but increased CB2 mRNA levels compared with control cells (Figure 8c). These results indicate that WIN treatment prevents CB2 decay during NE differentiation, which could mediate the NE differentiation inhibition induced by WIN.

DISCUSSION

The purpose of this study was to analyze the signaling pathway involved in NE differentiation of prostate LNCaP cells and the influence of WIN 55,212-2 on this process. Compelling evidence has implicated the endocannabinoid system in the regulation of cell fate. Natural cannabinoids as well as synthetic cannabinoid receptor ligands have been shown to reduce tumor cell proliferation, including prostate tumor cells.^{9,29} However, little is known about the role of cannabinoids on the NE differentiation of tumors. Here, we demonstrate that the cannabinoid WIN prevents NE differentiation of LNCaP cells by inhibition of PI3K/Akt/mTOR activation and stimulation of AMPK, providing a promising therapeutic opportunity for NE differentiated prostate cancer (Figure 9).

The PI3K/Akt/mTOR axis controls many functions in prostate cells including cell survival, growth and proliferation. Moreover,

preclinical studies reveal a dynamic interplay between PI3K and androgen receptor during the development of androgen-deprivation therapy resistance.³⁰ Therefore, it seems like the suppression of androgen signaling is one of the stimulus that induces activation of PI3K/Akt. According to this, it has been recently demonstrated that androgen receptor negatively regulates PI3K through repression of the regulatory subunit p85 α protein.³¹ Our results are in line with this idea as serum deprivation of LNCaP cells increased AKT phosphorylation at Ser473 as well as the phosphorylation of its downstream signaling protein S6, which correlated with the increase in NE markers expression. Similar results showed by Qi *et al.*³² indicate that androgen-depletion increased AR protein level and Akt phosphorylation at Ser473 and Thr308 in LNCaP cells. The importance of the PI3K/Akt signaling pathway in NE differentiation of LNCaP cells has been also reported by other groups.^{25,33} Long-term exposure of LNCaP cells to the cytokine IL-6 causes irreversible NE differentiation and activation of the PI3K/Akt cascade.^{26,34} Our results are in line with this notion as IL-6 treatment of LNCaP cells induced an increase of NE markers and p-mTOR. Activation of Akt has also been observed in other models of NE differentiation. For instance, NE differentiation of LNCaP cells by treatment with the neuropeptide VIP induces cAMP increase and activation of PKA and PI3K.³³ These results indicate that the activation of the PI3K/Akt route is a general mechanism associated with NE differentiation of prostate cells at least *in vitro*. Our results showing an inhibition of this pathway by the cannabinoid WIN indicate that

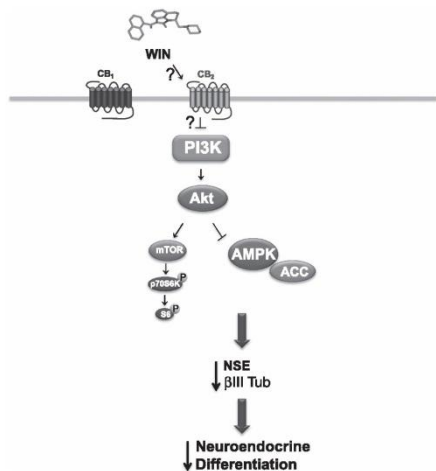


Figure 9. Proposed mechanism for WIN-induced inhibition of prostate LNCaP cells NE differentiation. The synthetic cannabinoid agonist WIN 55,212-2 (WIN) preserves the levels of the cannabinoid receptor CB2. This results in inhibition of the PI3K/Akt pathway. Akt signals through two pathways, activation of mTOR and inhibition of AMPK. The inhibition of Akt by the cannabinoid WIN produces inhibition of mTOR and activation of AMPK. Both phenomena cause inhibition of NE differentiation, although mTOR has a minor contribution than AMPK. ACC, acetyl CoA carboxylase; AMPK, AMP-dependent protein kinase; NE, neuroendocrine.

WIN is probably acting at the beginning of the process and that this cannabinoid may be useful for the treatment of NE cancers.

We believe our findings also demonstrate for the first time that AMPK is inhibited in NE cells. Similar to our findings demonstrating an inhibitory effect of AICAR on NED, activation of AMPK with metformin reduced the aggressiveness of NE tumors of the gastro-entero-pancreatic system.³⁵ Recent clinical studies on patients with well-differentiated pancreatic NE tumors, showed that the survival of metformin-treated patients was twice that observed in the control group.³⁶ To our knowledge, our work is the first study regarding the role of AMPK on NE differentiation of prostate cells. We also found that Akt activation is involved in the AMPK inactivation, and such AMPK inhibition contributes to NE differentiation of prostate LNCaP cells. Recent findings shown by other authors demonstrated that AKT activation induced AMPK Ser485 phosphorylation, which negatively regulated AMPK activity by inhibiting the Thr172 phosphorylation.³⁷ In line with this, results by Lin *et al.*³⁸ recently demonstrated that AKT activation in basophils could rapidly inhibit AMPK activation through increased AMPK phosphorylation at the inhibitory Ser485/491 residues, and this was accompanied by a reduction of ACC phosphorylation. In addition, data shown by Kim *et al.*³⁹ revealed that cortical neurons chronically treated with insulin underwent Akt activation, which provoked an increase of AMPK phosphorylation in Ser485 and inhibition of AMPK activity. Although we have not determined the AMPK phosphorylation in Ser485, our results show that inhibition of PI3K as well as Akt, abrogated the inhibition of AMPK in NE cells, providing a signaling link between Akt and AMPK in NED of prostate cells. Therefore, inhibition of PI3K/Akt by the cannabinoid WIN would remove the inhibitory phosphorylation of AMPK

resulting in AMPK activation and prevention of NE differentiation (Figure 9).

A major finding of our study is the spectacular decrease in cannabinoid receptors during the NE-differentiation process. The cannabinoid receptors would exert a tonic inhibition of NE differentiation in prostate cells even in the absence of ligand and, therefore, a decrease of cannabinoid receptors may be concomitant to NE differentiation.

In line with our results, data shown by Sugawara *et al.*⁴⁰ demonstrated that CB1 knockdown increased the differentiation of mast cells from resident progenitor cells and treatment with the endogenous cannabinoid ligand anandamide counteracted the activation of mast cells. The role of cannabinoid receptors in NE differentiation is not surprising as those receptors change their expression pattern along neuronal differentiation,⁴¹ and NE differentiation of prostate tumors resembles features of neurons. Further research with endocannabinoids and its receptors will throw additional light on the actions of these compounds on prostate tumors differentiation and growth.

In perspective, cannabinoids could represent a viable strategy to prevent or delay the progression of advanced prostate cancer with NE differentiation features.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Isabel Trabado and Pilar Rubio for technical assistance. This research has been supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant No. BFU2012-31444); Junta de Comunidades Castilla-La Mancha (Grant no. PO111-0159-0054); Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER); Comunidad de Madrid (Grant No. S2010-BMD2308); and the Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Grant No. Patrocinio 2013-001).

REFERENCES

- DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 2014; **64**: 252–271.
- Terry S, Beltran H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Front Oncol* 2014; **4**: 60.
- Li Z, Chen CJ, Wang JK, Hsia E, Li W, Squires J *et al.* Neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Asian J Androl* 2013; **15**: 328–332.
- Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, Arora V, Rickman D, Ayala G *et al.* Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2014; **20**: 2846–2850.
- Fukami K, Sekiguchi F, Yasukawa M, Asano E, Kasamatsu R, Ueda M *et al.* Functional upregulation of the H2S/Cav3.2 channel pathway accelerates secretory function in neuroendocrine-differentiated human prostate cancer cells. *Biochem Pharmacol* 2015; **97**: 300–309.
- Komiya A, Yasuda K, Watanabe A, Fujiiuchi Y, Tsuzuki T, Fuse H. The prognostic significance of loss of the androgen receptor and neuroendocrine differentiation in prostate biopsy specimens among castration-resistant prostate cancer patients. *Mol Clin Oncol* 2013; **1**: 257–262.
- Surcel CI, van Oort IM, Sooriakumaran P, Briganti A, De Visschere PJ, Futterer JJ *et al.* Prognostic effect of neuroendocrine differentiation in prostate cancer: a critical review. *Urol Oncol* 2015; **33**: 265 e261–e267.
- Berman-Booty LD, Knudsen KE. Models of neuroendocrine prostate cancer. *Endocrine-relat Cancer* 2015; **22**: R33–R49.
- Olea-Herrero N, Vara D, Malagarie-Cazenave S, Diaz-Laviada L. Inhibition of human tumour prostate PC-3 cell growth by cannabinoids R(+)-Methanandamide and JWH-015: involvement of CB2. *Br J Cancer* 2009; **101**: 940–950.
- Diaz-Laviada L. The endocannabinoid system in prostate cancer. *Nat Rev Urol* 2011; **8**: 553–561.
- Sarfraz S, Afaq F, Adhami VM, Malik A, Mukhtar H. Cannabinoid receptor agonist-induced apoptosis of human prostate cancer cells LNCaP proceeds through sustained activation of ERK1/2 leading to G1 cell cycle arrest. *J Biol Chem* 2006; **281**: 39480–39491.
- Nithipatikom K, Endsley MP, Isbell MA, Falck JR, Iwamoto Y, Hillard CJ *et al.* 2-arachidonoylglycerol: a novel inhibitor of androgen-independent prostate cancer cell invasion. *Cancer Res* 2004; **64**: 8826–8830.

- 13 Nithipatikom K, Gomez-Granados AD, Tang AT, Pfeiffer AW, Williams CL, Campbell WB. Cannabinoid receptor type 1 (CB1) activation inhibits small GTPase RhoA activity and regulates motility of prostate carcinoma cells. *Endocrinology* 2012; **153**: 29–41.
- 14 Sarfaraz S, Afaq F, Adhami VM, Mukhtar H. Cannabinoid receptor as a novel target for the treatment of prostate cancer. *Cancer Res* 2005; **65**: 1635–1641.
- 15 Thors L, Bergh A, Persson E, Hammarsten P, Stattin P, Egevad L *et al*. Fatty acid amide hydrolase in prostate cancer: association with disease severity and outcome, CB1 receptor expression and regulation by IL-4. *PLoS One* 2010; **5**: e12275.
- 16 Pertwee RG. Endocannabinoids and their pharmacological actions. *Handb Exp Pharmacol* 2015; **231**: 1–37.
- 17 Pertwee RG, Howlett AC, Abood ME, Alexander SP, Di Marzo V, Elphick MR *et al*. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIX. Cannabinoid receptors and their ligands: beyond CB(1) and CB(2). *Pharmacol Rev* 2010; **62**: 588–631.
- 18 Van Dross R, Soliman E, Jha S, Johnson T, Mukhopadhyay S. Receptor-dependent and receptor-independent endocannabinoid signaling: a therapeutic target for regulation of cancer growth. *Life Sci* 2013; **92**: 463–466.
- 19 Ramos-Torres A, Bort A, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. The pepper's natural ingredient capsaicin induces autophagy blockage in prostate cancer cells. *Oncotarget* 2015; **7**: 1569–1583.
- 20 Vara D, Morell C, Rodríguez-Henche N, Diaz-Laviada I. Involvement of PPAR-gamma in the antitumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* 2013; **4**: e618.
- 21 Cindolo L, Cantile M, Vacherot F, Terry S, de la Taille A. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: from lab to bedside. *Urol Int* 2007; **79**: 287–296.
- 22 Isgro MA, Bottoni P, Scatena R. Neuron-specific enolase as a biomarker: biochemical and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol* 2015; **867**: 125–143.
- 23 Weaver EM, Zamora FJ, Hearne JL, Martin-Carballo M. Posttranscriptional regulation of T-type Ca(2+) channel expression by interleukin-6 in prostate cancer cells. *Cytokine* 2015; **76**: 309–320.
- 24 Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ *et al*. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 2011; **71**: 1668–1679.
- 25 Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology* 2001; **142**: 4795–4805.
- 26 Xie S, Lin HK, Ni J, Yang L, Wang L, di Sant'Agnesse PA *et al*. Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. *Prostate* 2004; **60**: 61–67.
- 27 Hardie DG. AMPK—sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab* 2014; **20**: 939–952.
- 28 Zadra G, Batista JL, Loda M. Dissecting the dual role of AMPK in cancer: from experimental to human studies. *Mol Cancer Res* 2015; **13**: 1059–1072.
- 29 Velasco G, Sanchez C, Guzman M. Endocannabinoids and cancer. *Handb Experimental Pharmacol* 2015; **231**: 449–472.
- 30 Edlind MP, Hsieh AC. PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance. *Asian J Androl* 2014; **16**: 378–386.
- 31 Munkley J, Livermore KE, McClurg UL, Kalna G, Knight B, McCullagh P *et al*. The PI3K regulatory subunit gene PIK3R1 is under direct control of androgens and repressed in prostate cancer cells. *Oncoscience* 2015; **2**: 755–764.
- 32 Qi W, Morales C, Cooke LS, Johnson B, Somer B, Mahadevan D. Reciprocal feedback inhibition of the androgen receptor and PI3K as a novel therapy for castrate-sensitive and -resistant prostate cancer. *Oncotarget* 2015; **6**: 41976–41987.
- 33 Gutierrez-Canas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC *et al*. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *Prostate* 2005; **63**: 44–55.
- 34 Zhu Y, Liu C, Cui Y, Nadiminty N, Lou W, Gao AC. Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *Prostate* 2014; **74**: 1086–1094.
- 35 Vlotides G, Tanyeri A, Spampatti M, Zitzmann K, Chourdakis M, Sptt C *et al*. Anticancer effects of metformin on neuroendocrine tumor cells *in vitro*. *Hormones* 2014; **13**: 498–508.
- 36 Burney S, Khawaja KI, Saif MW, Masud F. Chemotherapy and metformin in pancreatic adenocarcinoma and neuroendocrine tumors. *J Pancreas* 2014; **15**: 313–316.
- 37 Horman S, Vertommen D, Heath R, Neumann D, Mouton V, Woods A *et al*. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase alpha-subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491. *J Biol Chem* 2006; **281**: 5335–5340.
- 38 Lin KC, Huang DY, Huang DW, Tzeng SJ, Lin WW. Inhibition of AMPK through Lyn-Syk-Akt enhances FcεpsilonRI signal pathways for allergic response. *J Mol Med* 2015; **94**: 183–194.
- 39 Kim B, Figueroa-Romero C, Pacut C, Backus C, Feldman EL. Insulin resistance prevents AMPK-induced Tau dephosphorylation through Akt-mediated increase in AMPKSer-485 phosphorylation. *J Biol Chem* 2015; **290**: 19146–19157.
- 40 Sugawara K, Biro T, Tsuruta D, Toth BJ, Kramminga A, Zakany N *et al*. Endocannabinoids limit excessive mast cell maturation and activation in human skin. *J Allergy Clin Immunol* 2012; **129**: 726–738 e728.
- 41 Galve-Roperh I, Chirchiu V, Diaz-Alonso J, Bari M, Guzman M, Maccarrone M. Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Progr Lipid Res* 2013; **52**: 633–650.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies the paper on the Prostate Cancer and Prostatic Diseases website (<http://www.nature.com/pcan>)

RESEARCH ARTICLE

Up-Regulated Expression of LAMP2 and Autophagy Activity during Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer LNCaP Cells

Cecilia Morell¹*, Alicia Bort¹*, Diana Vara-Ciruelos², Ágata Ramos-Torres¹, Manuel Altamirano-Dimas³, Inés Díaz-Laviada¹, Nieves Rodríguez-Henche¹*

1 Department of Systems Biology, Biochemistry and Molecular Biology Unit, School of Medicine and Health Sciences, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, **2** Cell Signalling and Immunology, College of Life Sciences, University of Dundee, Dundee, United Kingdom, **3** Vancouver Prostate Centre, Vancouver, British Columbia V6H 3Z6, Canada

* These authors contributed equally to this work.

* nieves.rhenche@uah.es



OPEN ACCESS

Citation: Morell C, Bort A, Vara-Ciruelos D, Ramos-Torres Á, Altamirano-Dimas M, Díaz-Laviada I, et al. (2016) Up-Regulated Expression of LAMP2 and Autophagy Activity during Neuroendocrine Differentiation of Prostate Cancer LNCaP Cells. *PLoS ONE* 11(9): e0162977. doi:10.1371/journal.pone.0162977

Editor: Srinivasa M Srinivasula, Indian Institute of Science Education and Research, INDIA

Received: March 16, 2016

Accepted: August 31, 2016

Published: September 14, 2016

Copyright: © 2016 Morell et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the University of Alcalá (Grant n° PI2005/063) to ART, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant n° BFU2012-31444), Junta de Comunidades Castilla-La Mancha and European Commission FEDER Funds (Grant n° POI11-0159-0054), Comunidad de Madrid (Grant S2010-BMD2308), and the Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Grant n° Patrocinio 2013-001) to AB. The funders had no role

Abstract

Neuroendocrine (NE) prostate cancer (PCa) is a highly aggressive subtype of prostate cancer associated with resistance to androgen ablation therapy. In this study, we used LNCaP prostate cancer cells cultured in a serum-free medium for 6 days as a NE model of prostate cancer. Serum deprivation increased the expression of NE markers such as neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III tub) and decreased the expression of the androgen receptor protein in LNCaP cells. Using cDNA microarrays, we compared gene expression profiles of NE cells and non-differentiated LNCaP cells. We identified up-regulation of 155 genes, among them LAMP2, a lysosomal membrane protein involved in lysosomal stability and autophagy. We then confirmed up-regulation of LAMP2 in NE cells by qRT-PCR, Western blot and confocal microscopy assays, showing that mRNA up-regulation correlated with increased levels of LAMP2 protein. Subsequently, we determined autophagy activity in NE cells by assessing the protein levels of SQSTM/p62 and LC3 by Western blot and LC3 and Atg5 mRNAs content by qRT-PCR. The decreased levels of SQSTM/p62 was accompanied by an enhanced expression of LC3 and ATG5, suggesting activation of autophagy in NE cells. Blockage of autophagy with 1 μ M AKT inhibitor IV, or by silencing Beclin 1 and Atg5, prevented NE cell differentiation, as revealed by decreased levels of the NE markers. In addition, AKT inhibitor IV as well as Beclin 1 and Atg5 knockdown attenuated LAMP2 expression in NE cells. On the other hand, LAMP2 knockdown by siRNA led to a marked blockage of autophagy, prevention of NE differentiation and decrease of cell survival. Taken together, these results suggest that LAMP2 overexpression assists NE differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation and facilitates autophagy activity in order to attain the NE phenotype and cell survival. LAMP2 could thus be a potential biomarker and potential target for NE prostate cancer.

in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Prostate cancer is the second most common cancer in men, with an estimated 1.1 million cases diagnosed worldwide in 2012 (GLOBOCAN 2012) [1]. Prostate cancer represents an important public health problem throughout the world and for developed countries in particular, since almost 70% of the cases (759,000) occur in more developed regions. Prostate tumors initially depend on androgens. Thus, androgen deprivation therapy (ADT) is used to treat advanced prostate and yields transient efficacy. This therapy consists in administrating LHRH agonists or antagonist which prevent the secretion of the pituitary hormone LH which, in turn, reduces the production of androgens by the testicles [2]. In addition, patients can also receive antiandrogen treatment to block the effects of adrenal residual androgens, this strategy has been termed "combined androgen blockage" [3–5]. Unfortunately, ADT has limited and transient efficacy and most patients receiving it progress to a more aggressive form of the disease termed castration-resistant prostate cancer (CRPC) [5, 6]. The mechanism by which resistance occurs has not been completely elucidated and thus represents a major clinical problem. There is evidence of androgen receptor (AR) reactivation despite decreased serum levels of androgens as an adaptive survival response [4].

One of the hallmarks of advanced prostate cancer is the acquisition of a neuroendocrine phenotype. Neuroendocrine differentiation (NED) is recognized as an adaptation response mechanism to hormonal therapy and represents an aggressive variant of prostate cancer [7, 8]. The amount of NED in prostate adenocarcinoma increases with disease progression and its incidence is expected to increase due to the use of new potent androgen signaling inhibitors in clinical practice [9]. Peptides produced by neuroendocrine (NE) cells, such as neuron-specific enolase (NSE) and chromogranin A, have been detected in the serum of advanced and CRPC patients [10–12]. How NE cells contribute to prostate cancer progression is yet unresolved. These cells are non-mitotic but secrete different neuropeptides and growth factors which could contribute to maintain homeostasis of surrounding cell populations [13]. NED is a highly heterogeneous phenomenon that points to poor prognosis [14, 15]. The origin of NE tumor cells has been hypothesized to arise by transdifferentiation from exocrine tumor cells since NE and exocrine tumor cells from radical prostatectomies share identical allelic profiles [16].

In vitro, prostate adenocarcinoma cells have the capacity to transdifferentiate to a neuroendocrine phenotype by exposure to stimuli such as dibutyryl-cyclic AMP [17, 18], forskolin and IL-6 [19], VIP [20] or hormone-depleted medium [21]. The LNCaP cell line is widely used as a cellular model to study the biology of NE transdifferentiation. In this study, we have used LNCaP cells to determine the gene expression profile in NED by performing genome-wide transcriptomic analysis. Our results show up-regulated expression of lysosome-associated membrane glycoprotein 2 (LAMP2) in NE-differentiated LNCaP cells.

LAMP2 is a single-span lysosomal membrane protein which maintains lysosomal stability and participates in autophagy [22]. Structurally, it consists of a polypeptide core of approximately 44 kDa with a short cytoplasmic tail (Ct), a transmembrane domain, and a large luminal domain with extensive N-glycosylation and some O-glycosylation (Nt) which forms a nearly continuous coat on the inner surface of the lysosomal membrane, protecting it from lysosomal proteolytic enzyme hydrolysis [23]. Apart from its role in maintaining the structural integrity of the lysosomal membranes, LAMP2 is critical for lysosomal function [24]. Mice lacking LAMP2 accumulate autophagic vacuoles in several tissues [25]. In humans, mutations in the LAMP2 gene cause Danon disease, an X-linked lysosomal storage disorder characterized by accumulation of vacuolar compartments in heart and skeletal muscle, leading to cardiomyopathy and myopathy [26, 27]. Three spliced variants of the LAMP2 gene generated by alternative splicing have been described: LAMP-2A, LAMP-2B and LAMP-2C, which differ in the

transmembrane and cytoplasmic domains [28]. LAMP-2A functions as a receptor of chaperone-mediated autophagy (CMA), a lysosomal proteolytic process known to be activated during starvation that removes damaged cellular proteins [29]; LAMP-2B is more abundantly expressed in muscle and brain and its absence is associated with Danon disease development; the LAMP-2C isoform functions as a receptor for RNA and DNA degradation [30, 31].

Macroautophagy (here referred to as autophagy) has emerged as a way to elude cancer therapy and to promote tumor progression [32, 33]. Prostate cancer treatments such as ADT, taxane and kinase inhibitors usually induce autophagy conferring resistance of prostate cancer cells to therapy. Therefore pharmacological inhibition of autophagy in combination with current prostate cancer therapies or chemotherapy drugs has been proposed as an alternative to improve prostate cancer treatments [34]. The aim of this study was to analyze the role of LAMP2 up-regulation in neuroendocrine differentiation of LNCaP cells and its relationship with autophagy.

Materials and Methods

Materials

Bafilomycin A₁ and 3-methyladenine (3-MA) were from Sigma (St. Louis, MO, USA). LY294002 was from Tocris (Bristol, UK) and Akt inhibitor IV was purchased from Calbiochem (Darmstadt, Germany). Primary antibodies used in this study were: monoclonal anti-NSE from DAKO (Glostrup, Denmark), monoclonal anti-LAMP2 from Abcam (Cambridge, UK), anti-p62, anti-pAkt, anti-Atg5 and anti-GAPDH from Cell Signalling Technology (Danvers, MA, USA), anti-Becn1 was from ThermoFisher Scientific (Alcobendas, Spain), polyclonal anti-LC3 from Novus (Abingdon, England, UK) and polyclonal anti- β III tubulin from Covance (Princeton, NJ, USA). The secondary antibodies were: peroxidase labeled anti-mouse IgG from Sigma (St. Louis, MO, USA) and anti-rabbit IgG from Calbiochem (Darmstadt, Germany).

Cell culture

The human prostate carcinoma cell line LNCaP was purchased from American Type Culture Collection (ATCC CRL-1740) (Rockville, MD, USA). Cells were used at passages 3 to 20 and routinely grown in complete medium consisting in RPMI 1640 medium containing phenol red and supplemented with 100 IU/ml penicillin G sodium, 100 μ g/ml streptomycin sulfate, 0.25 μ g/ml amphotericin B (Invitrogen, Paisley, UK) and 10% foetal calf serum. To elicit neuroendocrine differentiation, LNCaP cells were cultured as follows: cells were seeded at a density of 10,000 cells/cm² in complete medium. After 48 hours, the medium was replaced by serum-free medium (SF) and the cells were continuously cultured for 2 to 6 days without splitting. Cells seeded at the same density and cultured at the same time in a complete medium were used as a control. Most of the experiments were carried out with LNCaP cells cultured for 6 days in complete medium (C cells) or in SF medium (NE cells).

DNA microarray and differential gene expression analysis

Genome-wide transcriptomic analysis was performed using the whole human genome oligo microarray from Agilent platform GPL4133. Total RNA was isolated from LNCaP cells cultured in serum-free medium for 4 hours or 6 days using Trizol reagent according to the manufacturer's recommended protocol. RNA labeling, hybridization and washing were carried out following Agilent's instructions. Images of hybridized microarrays were acquired with a DNA microarray scanner. Data were background corrected and normalized using the quantile

method (Bolstad et al., 2003). Differential expression analysis was assessed using the linear modeling features of the Limma package from Bioconductor open source software (<http://www.bioconductor.org/>). DNA microarray assays and bioinformatic data analyses were carried out in the Genomics Unit of the Spanish National Center for Cardiovascular Research (CNIC, Madrid, Spain). Results from differential expression analysis were further analyzed for functional enrichment by using GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) v2.2.2 software [35] an open source tool from the Broad Institute (<http://software.broadinstitute.org/gsea/index.jsp>). Gene Ontology Molecular Process, Cellular Components and Molecular Function gene sets (GO:MP, GO:CC and GO:MF) were downloaded from the Broad Institute's Molecular Signature Database (version 4.0).

Western blotting

After treatments, cells were lysed in a lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4, 0.8 M NaCl, 5 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100) containing protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) and then cleared by microcentrifugation. Total protein content was measured by the BioRadTM protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) and 20 µg of protein were separated by electrophoresis on 15%–8% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto an Immobilon PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) at 100 V for 2 hours at 4°C. Membranes were incubated with the indicated primary antibodies overnight at 4°C and then with the respective secondary antibody. Visualization was performed by incubating the membrane for 3 min with enhanced chemo luminescence detection buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 1.25 mM luminol, 0.2 mM p-coumaric acid, and 0.03% H₂O₂) and exposed to an Curix RP2 Plus X-ray film (AGFA, Mortsel, Belgium). Densitometric analysis of the blot bands was performed by using Scion Image software (Scion Corporation, Informer Technologies, Inc). GAPDH was used as an internal control. For each blot, fold change in a protein expression level is calculated by dividing the density of each experimental condition by that from control sample. For each protein, data are expressed as the mean of the fold change and standard deviation obtained from at least three independent experiments.

Confocal microscopy

Cells were grown on glass coverslips and at the end of incubation period were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS and incubated with 0.1% Triton X-100 for permeabilization. Immunolabeling with primary antibody was performed by incubation at room temperature for 1h. Secondary labeling was performed with Alexa Flour 594, conjugated to anti-rabbit IgG and Alexa Flour 488 (Invitrogen). Coverslips were then mounted on slides with DAPI-containing mounting medium. Lysosomes were stained by loading cells with 50 nM lysotracker red (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) for 1 h before the end of the experiment. The cells were then fixed and permeabilized as described above. Imaging was performed with a Leica TCS SP5 laser-scanning confocal microscope with LAS-AF imaging software, using a 63X oil objective. Quantification of the confocal images was performed by using ImageJ v1.46 software (NIH Image) with co-localization analysis plugins for the quantitative co-localization study (Wright Cell Imaging Facility).

RT-qPCR

RNA extraction was carried out using the Trizol reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's recommended protocol. Two µg of total RNA were reverse transcribed with Transcriptor Reverse Transcriptase (Roche Applied

Science, Mannheim, Germany). Real-time quantitative PCR was performed to amplify between 25 and 100 ng of cDNA using the following pairs of primers: human NSE sense 5'-GGCTACACGGAAAAGATCGTTATT-3' and antisense 5'-GAAGGATCAGTGGGAGACTTGAA-3'; human LAMP2 sense 5'-TGCTGGCTACCATGGGGCTG-3' and antisense 5'-GCAGCTGCTGTGGAGTGAGT-3'; ATG sense 5'-CAACTTGTTCACGCTATATCAGG-3' and antisense 5'-CACTTTGTCAGTTACCAA CGTCA-3', human LC3 sense 5'-TGTCCGACTTATTCGAGAGCAGCA-3' and antisense 5'-TTCACCAACAGGAAGAAGGCCTGA-3', human 18S sense 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' and antisense 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' on the 7500 FAST Real Time PCR System (Applied Biosystems) with SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, USA). Target gene expression was normalized to 18S levels in respective samples as an internal control.

siRNA

Cells were transfected in Opti-MEM® 1 Reduced Serum Medium (Gibco, Thermo Fisher Scientific) containing 4 µg Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) with 100 nM of specific siRNA or control scrambled duplex for 12 h according to the manufacturer's protocols. The sequences of siRNAs used in this study were: LAMP2 5'-GCUGUGCGGUCUUAUGCAUdTdT-3' and ATG5: 5'-GUGAGAUUUGG UUUGAAUdTdT-3' (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Spain). For Beclin1 specific Silent Select siRNA was used (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Spain). Then the medium was removed and replaced by RPMI containing 10% FBS (control) or serum-free medium (NE) and cultured for 72 h. Afterwards, the cells were transfected a second time using the same conditions and maintained in culture for an additional 72 h. At the end of the incubation, the cells were used for western blot or cell viability assays.

Cell viability assay

For cell viability assays cells were seeded in a 12-well plate at a 50,000 cells per well and maintained for 48 h. Then the medium was changed for another medium without antibiotic and with or without 10% fetal bovine serum, cells were transfected with the corresponding siRNA and maintained in culture for 6 days. Cell viability was assayed by colorimetric MTT assay.

Statistical Analysis

All statistical analyze of the microarray data was carried out using R (Smyth GH 2005) in the Genomics Unit of the Spanish National Center for Cardiovascular Research (CNIC, Madrid, Spain). For the rest of the analyses, data are presented as the mean ± S.D. of at least three separate experiments. Statistical significance between groups was tested by Student's two-tailed and paired t-test using InStat software (Graphad SoftwareStat Software, San Diego, CA, USA). Differences among groups were considered significant when $P < 0.05$ or $P < 0.01$ as indicated.

Results

Serum deprivation induces neuroendocrine differentiation of LNCaP cells

LNCaP cells underwent neuroendocrine (NE) differentiation by serum deprivation of culture medium for 6 days (hereafter called NE cells). β III Tubulin (β III Tub) and neuron-specific enolase (NSE) levels were assessed as NE markers. Serum depletion increased the protein levels of β III Tub and NSE in LNCaP cells in a time-dependent manner (S1 Fig), reaching maximum values at 6 days of serum deprivation. Therefore, LNCaP cells cultured in serum-free medium

for 6 days were chosen for the rest of the studies as a NE differentiation model. In accordance with previous reports showing a reduced expression and/or activity of AR [36], NE cells showed a decreased AR expression besides to increased NE markers (Fig 1A). We then assessed the levels of NSE mRNA in NE and control cells by qRT-PCR (Fig 1B) and verified that increased protein levels of NSE correlated with enhanced levels of NSE mRNA in NE cells. In addition, and according to previously reports [18], we corroborated that the neuroendocrine phenotype of LNCaP cells is reversible since the levels of NE markers rise when SF medium is replaced with a complete medium and cells are maintained in culture for an additional 6 days (Fig 1C).

Differential gene expression in neuroendocrine differentiated LNCaP cells

In order to determine the gene expression profile of NE cells and the differentially expressed genes (DEGs) in NE cells versus control cells, we used cDNA microarray technology. From 15,450 genes analyzed in the microarray, 404 of them were differentially expressed in NE cells versus control cells. Among them, 155 genes were up-regulated and 249 genes were down-regulated in NE cells. The list of DEGs in NE cells is shown in supplemental data (S1 and S2 Tables). The analysis of differentially expressed genes corroborated the up-regulation of the NSE gene in NE cells. The functional analysis of DEGs using GSEA v2.2.2 software identified four categories of Biological Process (GO:BP) enrichment in NE cells. The enriched genes of "Anatomical_Structure_Development" and "Signal_Transduction" are shown in supplemental data (S2 Fig and S3 Table). Signal transduction enrichment was due to 22 DEGs from which interleukin 1 β (IL1 β) and a glutamate ionotropic receptor kainate type (GRIK1) were the most over expressed genes in NE cells, and cyclin A2 (CCNA2), topoisomerase 2A (TOP2A) and neuromedin U (NMU) were the most down regulated genes in these cells (S2 Fig and S3 Table). By contrast, the category Molecular Function (GO:MF) did not result in any outcome; whereas the Cellular Component (GO:CC) category identified an enrichment in membrane components ("Intrinsic_To_Membrane" and "Integral_To_Membrane") (Fig 2 and Table 1). Membrane component enrichment was due to 31 DEGs genes (Fig 2), from which 19 genes were up-regulated in NE cells (Table 1). Among the up-regulated genes, we detected high expression of the lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2), a membrane glycoprotein specific for late endosomes and lysosomes [37] which has been reported to be critical for lysosomal stability and lysosomal degradation of autophagic vacuoles [22, 38].

Confirmation of LAMP2 up regulation in neuroendocrine differentiated LNCaP cells

To validate the observed LAMP2 up-regulation in NE cells, we assessed LAMP2 protein expression by western blot and mRNA expression by quantitative RT-PCR, showing that NE cells overexpressed both LAMP2 protein and mRNA (Fig 3A and 3B). LAMP2 was observed as a completely glycosylated mature form (~ 110 kDa) and less glycosylated form (< 110 kDa). Overexpression of LAMP2 in NE cells was then further evaluated by immunofluorescence analysis. Confocal microscopy and quantitative analysis of confocal images showed a significantly increase of LAMP2 immunoreactivity in NE cells (Fig 3C). LAMP2 accumulated perinuclearly as well as at the edge and at the extensions of NE cells. Since LAMP2 is a membrane protein present in lysosomes, we used lysotracker, an acid-dependent dye, to determine colocalization of LAMP2 and these acidic subcellular compartments (Fig 3D). LysoTracker staining quantification demonstrated increased fluorescence in NE cells suggesting an increase in lysosomes as well as other acidic structures during the NE differentiation process. Moreover,

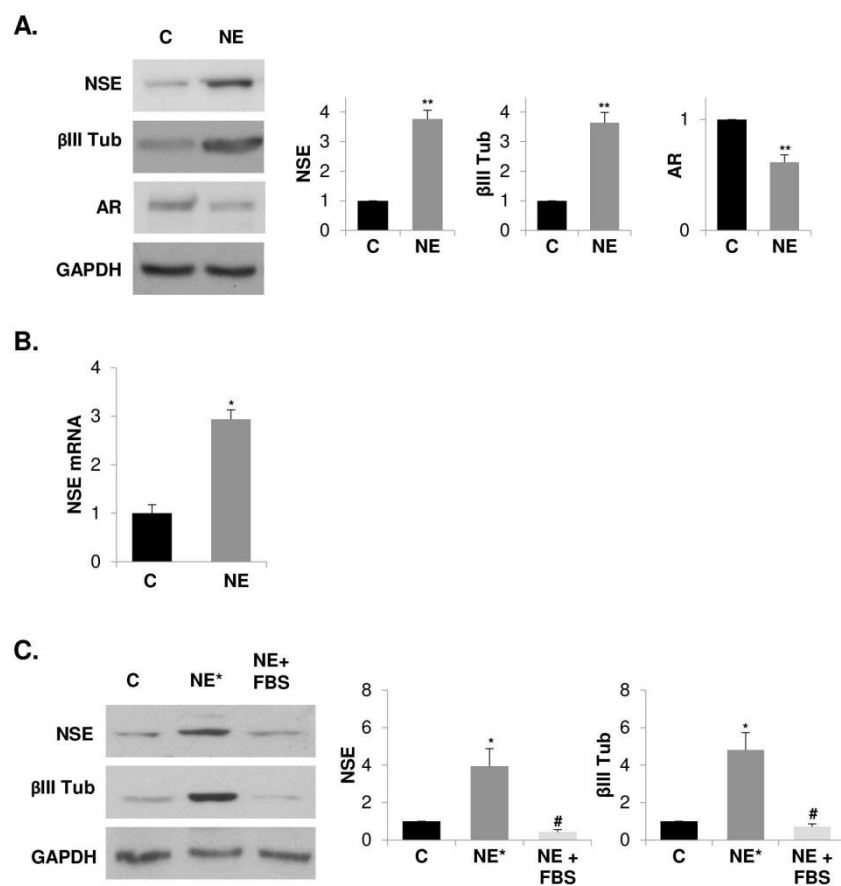


Fig 1. Serum withdrawal induces reversible neuroendocrine differentiation of LNCaP cells. (A) LNCaP cells cultured in serum-containing medium (C, control cells) or in serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days were lysed and neuron-specific enolase (NSE), βIII tubulin (βIII Tub) and androgen receptor (AR) were measured in whole lysates by western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. (B) Quantification of neuron-specific enolase (NSE) mRNA in control and NE cells by real time qRT-PCR. (C) LNCaP cells were grown in serum-containing medium (C, control cells), serum-free medium (NE* cells) during 12 days or serum-free medium for the first 6 days and then the medium was replaced by a serum-containing medium and cells were cultured for another 6 days (NE+FBS). Thereafter, cells were lysed and neuron-specific enolase (NSE) and βIII tubulin (βIII Tub) were measured in whole lysates by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. Results are the mean ± S.D. of at least three independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control cells and # $p < 0.05$ versus neuroendocrine cells, compared by the Student's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g001

the quantitative analysis of double-fluorescence staining revealed partial co-localization of LAMP2 and such acidic structures. In spite of both LAMP2 and lysotracker fluorescence are

NE	C	Gene Symbol
Red	Blue	GRIK1
Red	Blue	MPP1
Red	Blue	MDGA1
Red	Blue	OPRK1
Red	Blue	TRPC1
Red	Blue	ROB2
Red	Blue	GPA33
Red	Blue	NLGN1
Red	Blue	NBEA
Red	Blue	RHCE
Red	Blue	PLEKHB1
Red	Blue	LAMP2
Red	Blue	CPE
Red	Blue	SLC12A2
Red	Blue	SOBL1
Red	Blue	MAN1C1
Red	Blue	MME
Red	Blue	GBB10
Red	Blue	NCAM2
Red	Blue	RCL2L13
Blue	Red	TNFRSF4
Blue	Red	SSH1
Blue	Red	TMEM48
Blue	Red	EIF5A
Blue	Red	SEC22C
Blue	Red	ATAD5
Blue	Red	TMP0
Blue	Red	BDKRB1
Blue	Red	LMNB1
Blue	Red	CENPF
Blue	Red	TM4SF1

Fig 2. Heat map showing enrichment in membrane components from DEGs between NE and control cells. DEGs between NE and control cells were functionally assessed using GSEA. Gene Ontology gene sets were downloaded from the Broad Institute's Molecular Signature Database (version 4.0). Enrichment on gene set "intrinsic_to_membrane" is shown. Up-regulated (red) and down-regulated (blue) genes in NE and control cells are shown.

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g002

notably increased in NE cells, quantitative analysis of co-localization showed a similar extent of co-localization in control and NE cells. On the other hand, LAMP2 expression in plasma membranes has been detected in blood and tumor cells [39, 40] and we cannot rule out increased expression of LAMP2 in NE cells plasma membrane.

Autophagy is activated in neuroendocrine differentiated LNCaP cells

The elevated expression of LAMP2 in NE cells along with the previous knowledge of the critical role of LAMP2 for the fusion of autophagic vacuoles with lysosomes [25] suggested that neuroendocrine differentiation might activate autophagy in LNCaP cells. To explore the status of

Table 1. List of genes included in the gene set "Intrinsic_to_membrane" that are UP- or DOWN-regulated in neuroendocrine cells. FC*: Fold change.

Symbol	Gene ID	Gene NAME	FC*
CPE	1363	carboxypeptidase E	3,97
GPA33	10223	glycoprotein A33 (transmembrane)	3,42
GRB10	2887	growth factor receptor-bound protein 10	4,12
GRIK1	2897	glutamate receptor, ionotropic, kainate 1	13,86
LAMP2	3920	lysosomal-associated membrane protein 2	3,31
MAN1C1	57134	mannosidase, alpha, class 1C, member 1	3,06
MDGA1	266727	MAM domain containing glycosylphosphatidylinositol anchor 1	4,72
MME	4311	membrane metallo-endopeptidase	3,61
MPP1	4354	membrane protein, palmitoylated 1, 55kDa	5,31
NBEA	26960	neurobeachin	3,82
NCAM2	4685	neural cell adhesion molecule 2	3,18
NLGN1	22871	neuroligin 1	3,58
OPRK1	4986	opioid receptor, kappa 1	9,90
PLEKHB1	58473	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	3,74
RHCE	6006	Rh blood group, CcEe antigens	3,01
ROR2	4920	receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2	3,74
SLC12A2	6558	solute carrier family 12 (sodium/potassium/chloride transporters), member 2	3,24
SORL1	6653	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing	3,60
TRPC1	7220	transient receptor potential cation channel, subfamily C, member 1	3,33
ATAD5	79915	ATPase family, AAA domain containing 5	-2,68
BCL2L13	23786	BCL2-like 13 (apoptosis facilitator)	-2,66
BDKRB1	623	bradykinin receptor B1	-3,87
CENPE	1062	centromere protein E, 312kDa	-15,75
EIF5A	1984	eukaryotic translation initiation factor 5A	-3,18
LMNB1	4001	lamin B1	-8,29
SEC22C	9117	SEC22 vesicle trafficking protein homolog C (S. cerevisiae)	-2,80
SSH1	54434	slingshot homolog 1 (Drosophila)	-3,18
TM4SF1	4071	transmembrane 4 L six family member 1	-15,42
TMEM48	55706	transmembrane protein 48	-5,63
TMPO	7112	thymopoietin	-3,99

doi:10.1371/journal.pone.0162977.t001

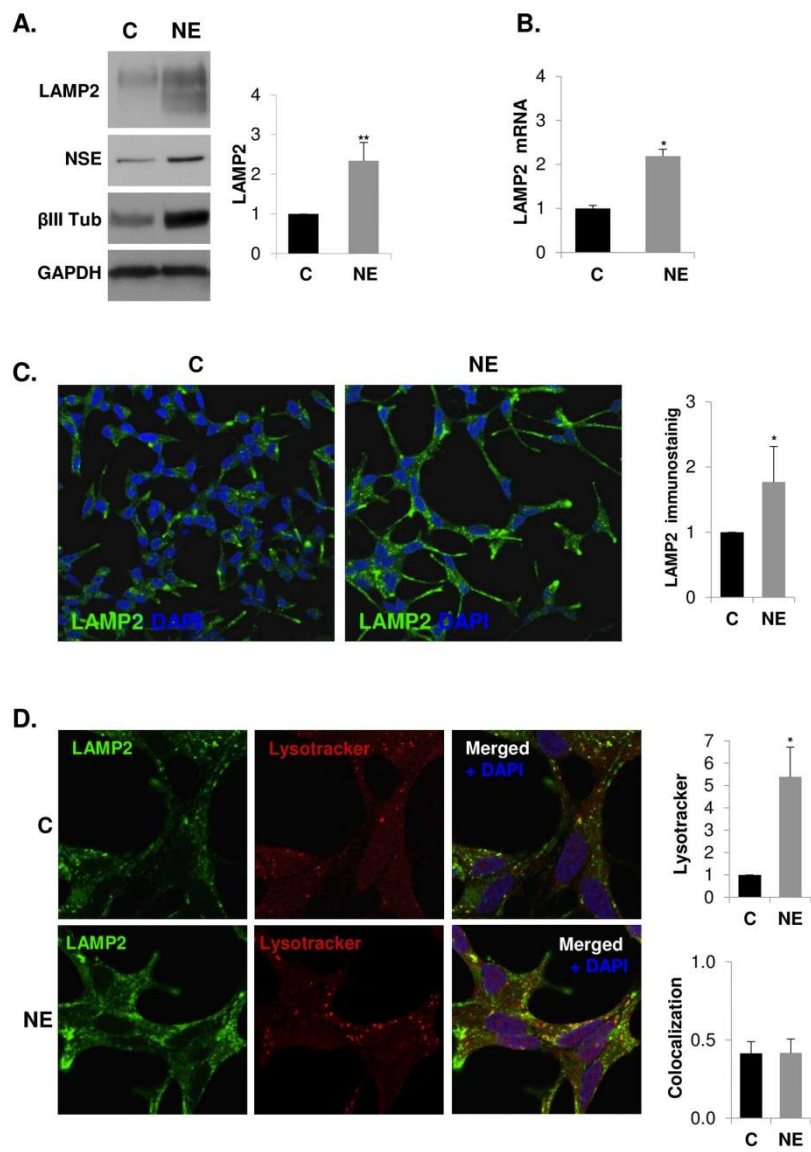


Fig 3. Lysosomal-associated membrane protein 2 (LAMP2) is over-expressed in neuroendocrine differentiated LNCaP cells. LNCaP cells were grown in serum-containing medium (C, control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days. **(A)** LAMP2 was measured in whole lysates of C and NE cells by western blot along with neuroendocrine markers neuron-specific enolase (NSE) and β III tubulin (β III Tub). GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. **(B)** Quantification of LAMP2 mRNA in control and NE cells by real time qRT-PCR. Results are the mean \pm S.D. of at least three independent experiments (* $p < 0.05$ versus control cells compared by the Student's t test). **(C)** Detection of LAMP2 by immunofluorescence (green). Nuclei are stained with DAPI (blue). Immunofluorescence was analyzed by confocal microscopy. Quantitative analysis of lysotracker and LAMP2 was performed using ImageJ software (NIH).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g003

autophagy in NE cells, we determined the protein levels of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) by western blot. During autophagy, the LC3 precursor is cleaved at its C-terminus to form a truncated cytosolic form named LC3-I. LC3-I is then conjugated with phosphatidylethanolamine and bound to the autophagosome membrane to form LC3-II. Therefore, LC3-II levels could be used as an autophagosome accumulation marker. However, as autophagy is a dynamic process, increased levels of LC3-II could also reflect a reduction in autophagosome turnover or even induction of autophagy with impaired turnover ability. To distinguish such situations, LC3-II should be detected in the absence and in the presence of inhibitor of lysosome activity such as lysosomal proteases E64 and pepstatin A or bafilomycin A₁, which prevents LC3-II turnover by inhibiting lysosomal proteolytic activity and, in the case of bafilomycin A₁, autophagosome-lysosome fusion [41]. Autophagosome turnover can also be determined by measurement of the adaptor protein sequestosome 1 (SQSTM1/p62), a protein that recruits ubiquitinated proteins to autophagosomes and whose levels inversely correlate with activation of autophagy [41, 42]. NE cells showed an increase in LC3-II and a decrease in p62 levels compared with control LNCaP cells, and such variations were detected when E64 and pepstatin A or 100 nM bafilomycin A₁ was present in the culture medium during the last three hours (S3 Fig and Fig 4A), suggesting an induction of autophagic flux in NE cells.

To corroborate autophagy activation in NE cells, we labeled endogenous LC3 by immunofluorescence (Fig 4B). Confocal microscopy images showed diffuse cytoplasmic staining of LC3 in control cells and a punctuate LC3 pattern in NE cells, and as expected such switch was notably stronger when bafilomycin A₁ was present. Quantitative analysis of confocal images revealed a significant increase of LC3 immunostaining in NE cells corroborating western blotting results. It should be noted that bafilomycin A₁ treatment exerted a significantly lower accumulation of LC3 immunostaining in control than in NE cells, suggesting that autophagic flux is greater in NE cells than in control cells.

Although the transcriptional regulation of autophagy has not been closely correlated with functional autophagy, new studies propose a post-transcriptional regulation at the level of gene expression, particularly in long-term autophagic response and in genes involved in the later stages of autophagy [43]. Using qRT-PCR, we determined the mRNA levels of the ATG5 and LC3 genes, which are required for phagophore expansion and autophagosome formation, respectively (Fig 4C). We detected enhanced levels of ATG5 and LC3 mRNA suggesting up-regulated expression of both genes in NE cells. In the case of LC3, increased mRNA levels correlate with greater protein content, suggesting that transcriptional induction may be necessary to replenish the LC3 protein that is turned over during autophagy flux activation.

Autophagy inhibition prevents neuroendocrine differentiation of LNCaP cells

To assess the role of autophagy activity on neuroendocrine differentiation of LNCaP cells, we silenced Beclin1, an autophagy gene which interacts with class III PI3K to initiate autophagosome formation, and Atg5, which form part of the complex Atg5-Atg12/Atg16L involved in

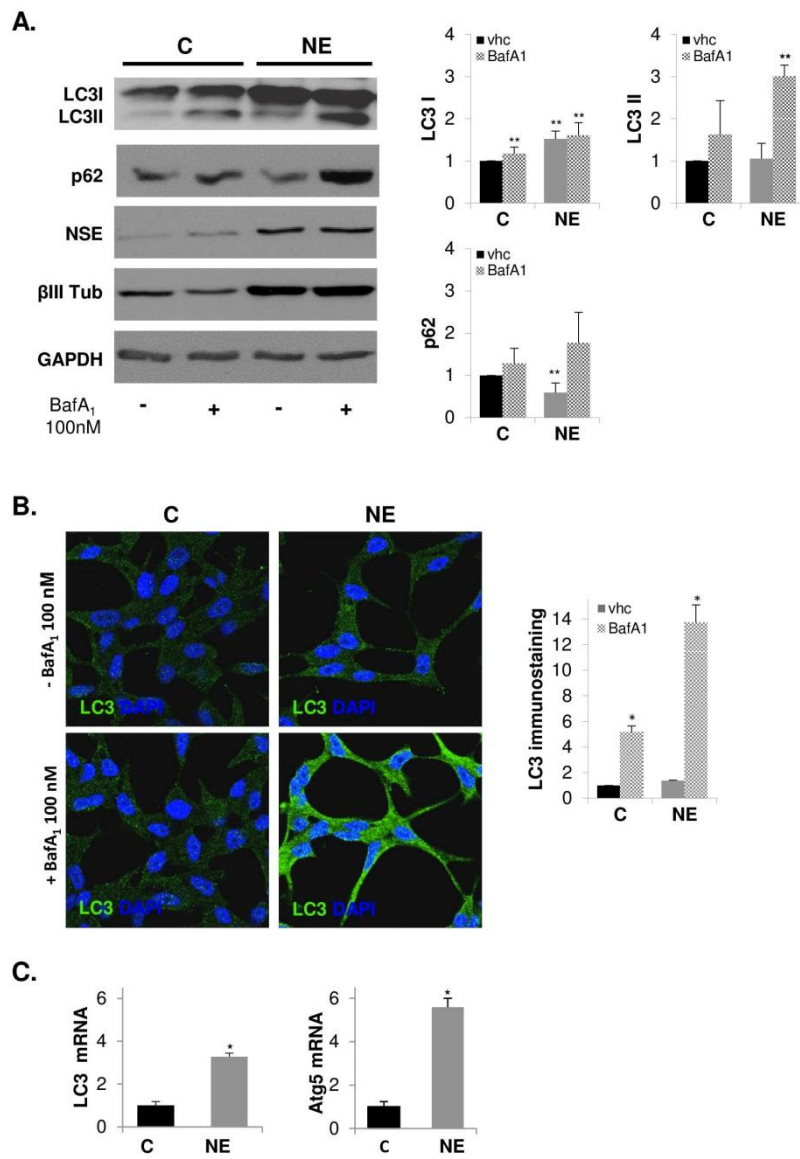


Fig 4. Autophagy is activated in neuroendocrine differentiated LNCaP cells. LNCaP cells were grown in serum containing medium (C, control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days, and when indicated 100 nM Bafilomycin A₁ was added to the culture medium for the last three hours. **(A)** Autophagy activation markers, LC3 and p62, along with neuroendocrine markers NSE and β III Tub were measured in whole lysates of C and NE cells by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. **(B)** Detection of LC3 protein by immunofluorescence (green) and nuclei with DAPI (blue). Immunofluorescence was analyzed by confocal microscopy. Quantitative analysis of LC3 was performed using ImageJ software (NIH). **(C)** Quantification of LC3 and Atg5 mRNA in control and NE cells by real time qRT-PCR. Results are the mean \pm S.D. of at least three independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus control cells and # $p < 0.05$ versus neuroendocrine cells, compared by the Student's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g004

LC3 lipidation (Fig 5). Loss of expression of Beclin 1 and Atg5 was verified by Western blotting. Next, we evaluated autophagy activity by measuring LC3 and p62 protein levels. Beclin1 and Atg5 silencing resulted in accumulation of p62 protein in both control and NE cells, demonstrating an efficient blockage of autophagy. In the case of LC3 levels, we observed that Beclin1 and Atg5 knockdown exerted opposite effect, while Beclin1 knockdown decreased LC3I protein levels, Atg5 elicited notably accumulation of LC3I in both control and NE cells. Regarding NE markers, Beclin 1 and Atg5 knockdown significantly reduced NSE protein levels in NE cells and, in a less extent, those of β III tub. Taken together, those results clearly demonstrate that autophagy activity supports NED of LNCaP cells.

LAMP2 knockdown prevents autophagy, neuroendocrine differentiation and survival of LNCaP cells

To answer the question of whether LAMP2 up-regulation is required to induce NED and autophagy in LNCaP cells, LAMP2 was knocked down in control and NE cells by interference RNA. Loss of expression of LAMP2 in cells transfected with siLAMP2 was verified by Western blotting (Fig 6A). Silencing of LAMP2 in NE cells significantly decreased the levels of the neuroendocrine marker β III Tub but not those of NSE. Autophagy activity was evaluated by measuring p62 levels in whole lysates. siLAMP2 resulted in an accumulation of the cargo protein p62 in both control and NE cells, indicating that knocking down of LAMP2 blocks the fusion of autophagosomes and lysosomes, as has been previously reported [25]. In addition, LAMP2 knockdown significantly reduced cell viability of both control and NE LNCaP cells (Fig 6B). These findings strongly support a role of LAMP2 on autophagy activity as well as on survival and NED of LNCaP cells.

Autophagy inhibition decreases LAMP2 levels and survival of neuroendocrine differentiated LNCaP cells

Next, we determine whether autophagy activity play a role in regulating LAMP2 expression. We examine LAMP2 protein levels in Beclin1 and Atg5 silenced control and NE LNCaP cells (Fig 7A). Blockage of autophagy by knocking down Beclin1 or Atg5 significantly decrease LAMP2 protein levels in NE cells. A similar effect was also observed in control LNCaP cells. Since LAMP2 knockdown elicited a dramatic decrease in cell survival, we examine cell viability in Beclin1 and Atg5 silenced cells (Fig 7B). Beclin1 knockdown significantly decreased survival of both control and NE cell, whether such effect is related with diminished levels of LC3 observed in Beclin 1 silenced cells (Fig 5) should be further analyzed. In contrast, Atg5 knockdown had no effect on viability of control LNCaP cells but significantly decreased cell survival of NE cells. These results demonstrated that autophagy activity contributes to regulates LAMP2 protein level and NE cells survival.

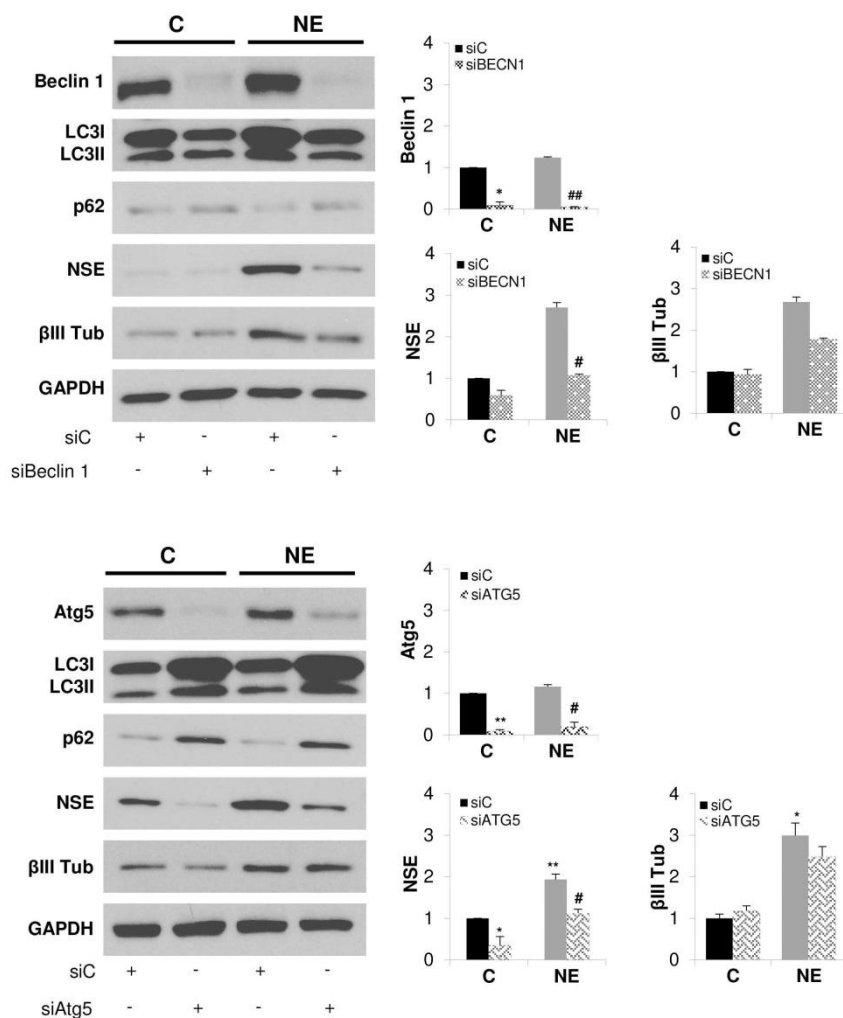


Fig 5. Autophagy blocking prevents neuroendocrine differentiation of LNCaP cells. LNCaP cells grown in serum-containing medium (C, control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) were transfected with negative control siRNA (siC) or siRNA targeting Beclin1 (siBeclin1) or siRNA targeting Atg5 (siATG5) during 6 days. Thereafter, cells were lysed and Beclin1 or Atg5, autophagy markers, LC3 and p62, and neuroendocrine markers, NSE and β III Tub were measured in whole lysates by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. Results are the mean \pm S.D. of at least three independent experiments (* p <0.05 and ** p <0.01 versus non-treated control cells and # p <0.05 versus non-treated neuroendocrine cells, compared by the Student's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g005

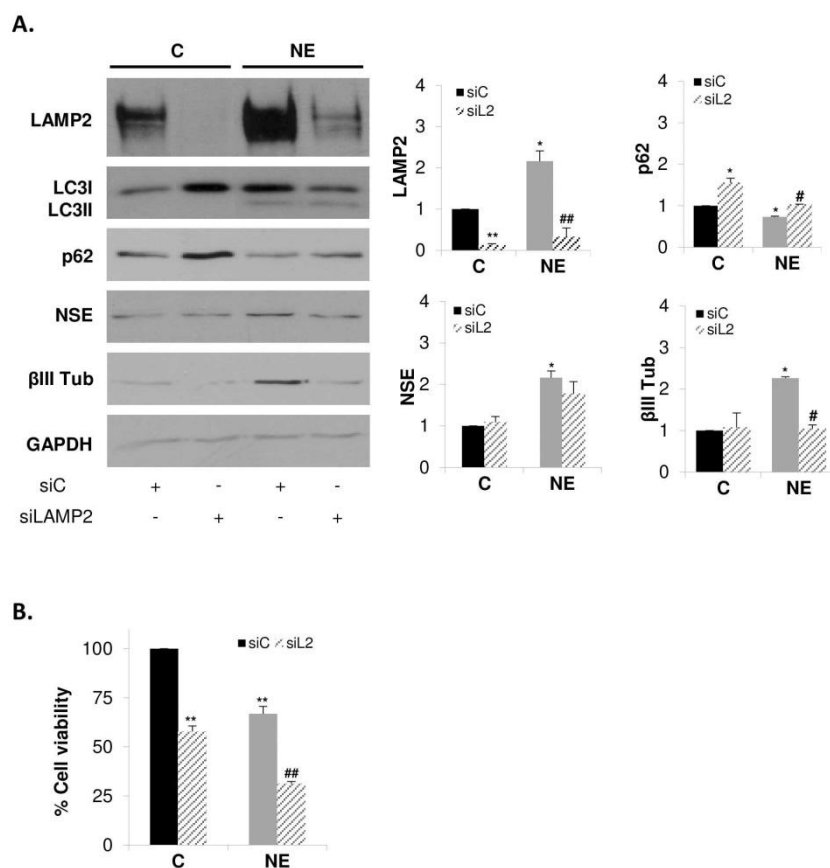


Fig 6. LAMP2 knockdown prevents autophagy, neuroendocrine differentiation and survival of LNCaP cells. LNCaP cells were transfected with negative control siRNA (siC) or siRNA targeting LAMP2 (siLAMP2) and grown in serum-containing medium (C, control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days. **(A)** Cells were lysed and LAMP2, autophagy markers, LC3 and p62, and neuroendocrine markers, NSE and βIII Tub, were measured in whole lysates by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. **(B)** Cell viability of control and NE cells treated with siC or siLAMP2 was monitored by MTT assay. Results are the mean ± S.D. of at least three independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus siC transfected control cells and # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus siC transfected neuroendocrine cells, compared by the Student's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g006

Inhibition of AKT blocks autophagy and prevents overexpression of LAMP2 and neuroendocrine differentiation of LNCaP cells

We and others have reported the importance of the PI3K/AKT/mTOR pathway for NE differentiation [20, 44, 45]. In addition, we have very recently demonstrated that serum deprivation

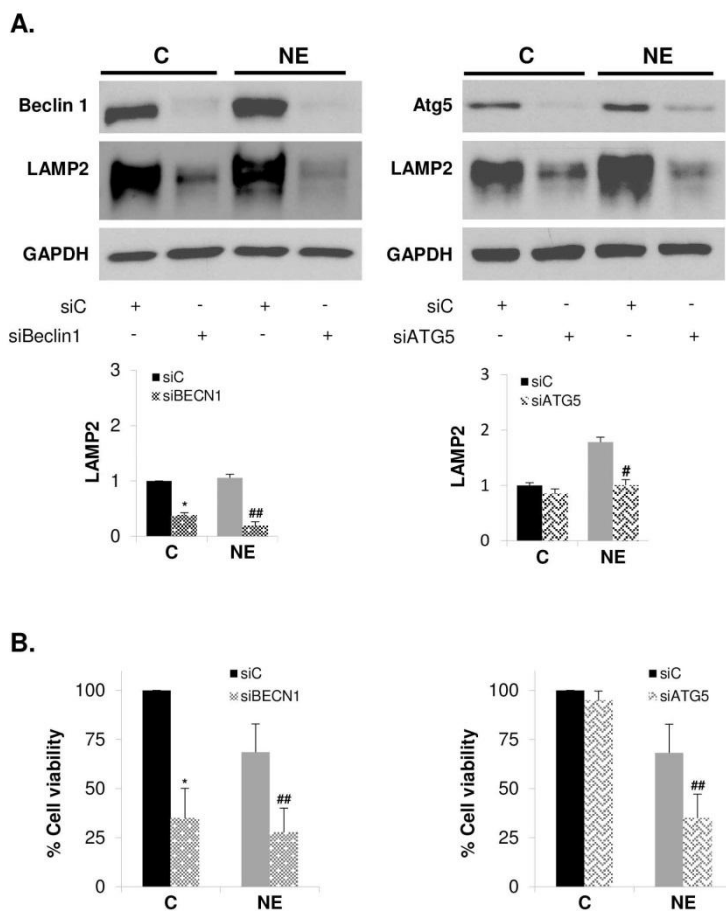


Fig 7. Autophagy inhibition decrease LAMP2 levels and survival of neuroendocrine differentiated LNCaP cells. LNCaP cells were transfected with negative control siRNA (siC) or siRNA targeting Beclin 1 (siBeclin1) or siRNA targeting Atg5 (SiATG5) and grown in serum containing medium (C, control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days. **(A)** Cells were lysed and Beclin 1 (left), Atg5 (right) and LAMP2 were measured in whole lysates by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown below. **(B)** Cell viability of control and NE cells treated with siC, siBeclin 1 (left) or SiATG5 (right) was monitored by MTT assay. Results are the mean \pm S.D. of three independent experiments (* $p < 0.05$ versus siC transfected control cells and # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ versus siC transfected neuroendocrine cells, compared by the Student's t test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g007

of LNCaP cells increases AKT phosphorylation at Ser473 as well as the phosphorylation of its downstream signaling protein S6, which correlates with the increase in NE markers expression

[46]. Here, and to gain a deeper understanding of the relationship between LAMP2, autophagy and NE differentiation of LNCaP cells, we investigated the effect of the pharmacological inhibition of AKT on autophagy, LAMP2 and NE markers expression in LNCaP cells (Fig 8). In some conditions, cells were treated with Bafilomycin A₁ during the last three hours in culture in order to block autophagy flux for better recover LC3II signal. Treatment of cells with the selective AKT inhibitor IV resulted in accumulation of the cargo protein p62, and a decrease of the expression of LAMP2 and NE markers in NE cells, indicating that AKT activity regulates autophagic flux, LAMP2 expression and neuroendocrine differentiation.

Discussion

NED is one of the hallmarks of advanced castration-resistant prostate cancer and has been proposed as a mechanism of resistance to current therapies [8]. Using expression microarrays, we have identified 404 genes differentially expressed between NE-differentiated and non-differentiated LNCaP cells. Among them, 155 genes were up-regulated including LAMP2, and 249 genes were down-regulated in NE cells.

LAMP2 plays an important role in lysosomal stability as well as in autophagy. Lysosomes are cellular compartments that digest and recycle materials and cancer cells are dependent of effective lysosomal function [47]. A reduction of LAMP2 protein levels triggers lysosomal membrane permeabilization and sensitizes cells to the lysosomal cell death pathway [48]. Several lines of evidence associate enhanced levels of LAMP2 with tumor progression. The majority of cancer cells display LAMP2 expression and, surprisingly, the prostate along with the thyroid gland are the tissues which show the strongest immunoreactivity against LAMP2 (the human protein atlas; <http://www.proteinatlas.org/>). In colorectal cancer epithelium, LAMP1 and LAMP2 levels are increased, suggesting that LAMPs are related to neoplastic progression, but there is no direct association between such up-regulated expression and cell proliferation [49]. Our results show that in NE cells, LAMP2 is up-regulated, both at the level of mRNA. This overexpression was accompanied by increased autophagy activity. In addition, knock-down of LAMP2 hampered NED, as demonstrated by the decreased levels of NE markers, cell survival and prevented autophagy, as demonstrated by p62 protein accumulation. To our knowledge, this is the first report showing the involvement of LAMP2 in NE differentiation of prostate cancer cells. Lysosomes are the terminal degradative compartment for autophagy and LAMP2 plays a critical role in the fusion of autolysosomes with lysosomes to form the hybrid structure called autophagolysosome. Reduced fusion has been shown in cells depleted of LAMP2 as demonstrated in LAMP2 knockout mice which showed accumulation of autophagic vacuoles in several tissues [25] and in patients with Danon disease [26, 27]. The increased expression of LAMP2 could help NE cells increase the fusion activity between lysosomes and autophagosomes, leading to the increased autophagy activity shown in NE cells and constituting a survival signal for NE cells. In breast tumors, LAMP-2A overexpression leads to CMA activation and cancer cell survival [50]. Moreover, Kon *et al.* have been shown overexpression of LAMP-2A and CMA activation in more than 40 different types of human tumors when compared with normal tissue surrounding the tumors. In line with this, blockage of CMA reduces the metastatic capacity of lung cancer cells due to the reduced capacity of tumor cells to sustain their enhanced metabolic activity [51]. However, we have not investigated whether CMA was enhanced in NE cells. This question will be addressed in future studies.

LAMP2 expression is not exclusive of lysosomal and late endosomal membranes. It can also be associated to the cell plasma membrane. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) have been shown to express LAMP2 in their plasma membrane. Moreover, stimulation of PBMC with the lectin phytohemagglutinin increased LAMP2 levels, a rise which was

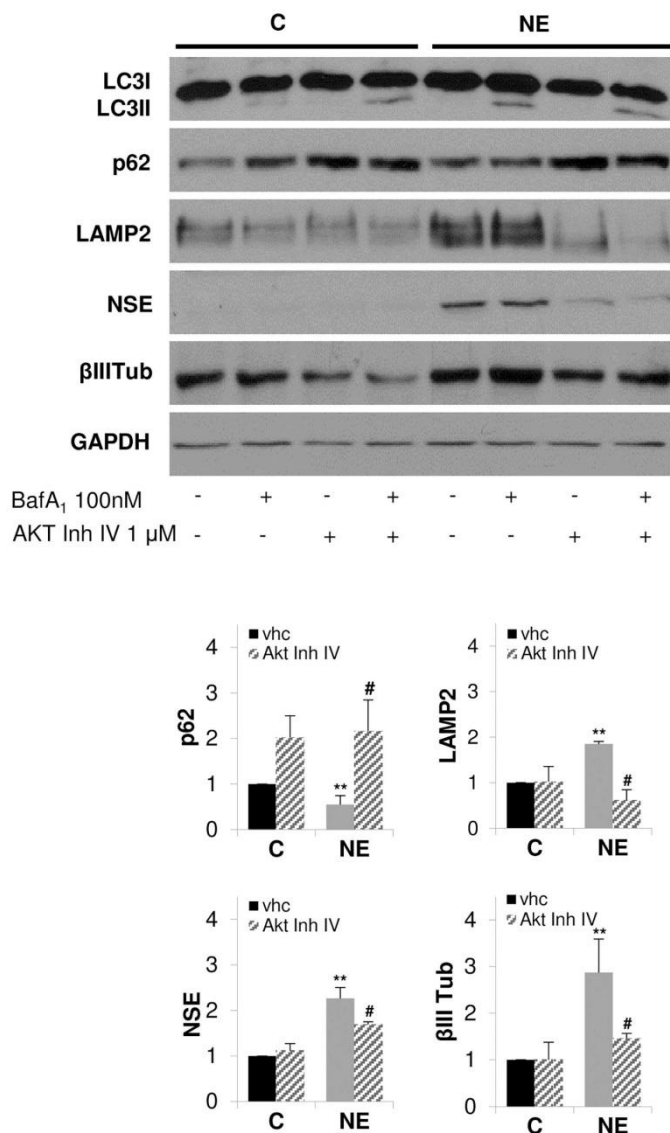


Fig 8. Pharmacological inhibition of AKT prevents autophagy, LAMP2 overexpression and neuroendocrine differentiation of LNCaP cells. LNCaP cells were grown in serum-containing medium (C,

control cells) or serum-free medium (NE, neuroendocrine cells) during 6 days. Cells were treated with vehicle (veh) or 1 μ M AKT inhibitor IV for 6 days. When indicated, cells were treated with 100 nM bafilomycin A₁ for the last three hours in culture. Thereafter cells were lysed and autophagy markers, LC3 and p62, LAMP2 and neuroendocrine markers, NSE and β III Tub, were measured in whole lysates by Western blot. GAPDH was used as a loading control. Densitometric analysis of the Western blot bands are shown on the right. Results are the mean \pm S.D. of at least three independent experiments (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ versus not treated control cells and # $p < 0.05$ versus not treated neuroendocrine cells, compared by the Student's *t* test).

doi:10.1371/journal.pone.0162977.g008

involved in PBMC adhesion to vascular endothelium [39]. More recently, Damaghi et al. have shown LAMP2 overexpression in plasma membranes of MCF-7 breast cancer cell line, adapted to grow in acidic conditions, both *in vitro* and *in vivo* [40]. They extended their studies to breast cancer patients and showed enhanced levels of LAMP2 in breast cancer tumors as compared to normal tissue. This increase correlated with increased tumor progression. The authors explain the overexpression of LAMP2 as an adaptation mechanism to chronic acidosis in the tumor microenvironment, since depletion of LAMP2 is sufficient to increase acidosis-mediated toxicity and, interestingly, tap-water bicarbonate sodium therapy reduces LAMP2 expression. They propose the use of LAMP2 as a marker to quantify the presence of acidity in biopsies of solid tumors as well as a novel therapeutic target [40]. It is important to note that in TRAMP mice, an animal model of prostate cancer that displays NE differentiation, systemic sodium bicarbonate buffer administration inhibits carcinogenesis [52]. It will be interesting to investigate the expression levels of LAMP2 in tumors of this prostate cancer animal model to elucidate its possible role in tumor progression, and extend these studies to other NE prostate cancer models such as xenografts.

Macroautophagy (here referred to as autophagy) has emerged as a way to elude cancer therapy and to promote tumor progression [32, 33]. Prostate cancer treatments such as ADT, taxane and kinase inhibitors usually induce autophagy conferring resistance of the prostate cancer cells to therapy. Hence, pharmacological inhibition of autophagy in combination with current prostate cancer therapies or chemotherapy drugs may improve prostate cancer treatments [34]. Here, we show significant increase of ATG5 and LC3 mRNA levels as assessed by qRT-PCR that correlates with increased levels of LC3 protein and elevated autophagy flux, as assessed by decreased levels of p62 in NE cells. In addition, the pharmacological and molecular inhibition of autophagy, besides blocking autophagy flux, prevents NE differentiation of LNCaP cells, as shown by decreased levels of NE markers as well as cell survival. These results demonstrate that autophagy activation is required for survival and NE differentiation of LNCaP cells. The importance of PI3K/AKT/mTOR pathway on autophagy regulation is well established [53]. During starvation, mTOR is inhibited allowing autophagy to be activated. Surprisingly, here we observed that autophagy is activated in NE cells along with PI3K/AKT/mTOR activation, maybe because, as has been previously described [54], in prolonged starvation systems mTOR reactivation is required for the degradation of autolysosomes. We cannot discard such possibility in our model of NED since serum-starvation lasts for 6 days. On the other hand, Matsuda-Lennikov et al. have recently demonstrated that accumulation of AKT at the lysosomal membrane is critical for autophagy induction [55]. It seems that spatial control of AKT determines autophagy activity, thus AKT targeted to plasma membrane via class I PI3K production of PtdIns(3,4,5)P₃ inhibits autophagy, while AKT targeted the lysosome via class III PI3K generation of PtdIns(3)P promotes autophagy [55, 56]. We showed that AKT inhibition disrupts autophagy and NE differentiation of LNCaP cells, however we not known AKT subcellular localization. Accordingly with our results, Fan et al. reported that AKT and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistance glioma [57].

Autophagy activation is also reported in NE differentiation induced by IL-6 treatment of LNCaP, conferring resistance to etoposide treatment [58]. IL-6 treatment down-regulates the expression of REST (repressor element-1 silencing transcription factor) [58, 59], a neuronal transcriptional repressor known to be down-regulated in neuroendocrine prostate cancer [60], and the decreased levels of REST allow LNCaP cells to activate autophagy [58]. In our model of NED, we did not observe changes in the expression of REST, suggesting that the driving force to achieve the NE phenotype is quite different in IL-6-treated and serum-starved LNCaP cells. In our model, we have demonstrated that serum-deprivation induction of NE marker expression is correlated with increased AKT activity and decreased AMPK activity and that the cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits PI3K/AKT, resulting in AMPK activation and prevention of NED [46]. In this study, we extend these results showing that the induction of autophagy by serum starvation is dependent on AKT activity since AKT inhibitor IV blocks autophagy and prevents overexpression of both LAMP2 and NE markers. A role of autophagy in protein trafficking and secretion pathway has been proposed [61, 62], so the activation of autophagy and LAMP2 overexpression observed in our model of NED could be related with the secretory activity of neuroendocrine cells.

In summary, we describe, for the first time, the up-regulation of LAMP2 as a survival signal for NE differentiation of LNCaP cells induced by serum deprivation during 6 days. LAMP2 could thus be a molecular component of NE differentiation and could be used as a NE marker. Further studies are warranted in order to gain a better understanding of the complex NE differentiation process.

Supporting Information

S1 Fig. Time course variation of NE marker proteins in LNCaP cells cultured in serum free medium.

(PPTX)

S2 Fig. Heat map showing enrichment in GO:BP "Anatomical_Structure_Development" and "Signal_Transduction" from DEGs between NE and control cells.

(PPTX)

S3 Fig. Time course of LC3 levels in LNCaP cells cultured in serum-free medium.

(PPTX)

S1 Table. DEGs in NE cells. Up-regulated genes.

(DOCX)

S2 Table. DEGs in NE cells. Down-regulated genes.

(DOCX)

S3 Table. List of genes included in GO: BP "Anatomical_Structure_Development" and "Signal_Transduction" gene sets that are UP and DOWN-regulated in neuroendocrine cells. FC*: Fold change.

(DOCX)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Lilian Puebla for English assistance and Isabel Trabado and Pilar Rubio for technical assistance. This research has been supported by the University of Alcalá (Grant n° P12005/063); the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grant n° BFU2012-31444); Junta de Comunidades Castilla-LaMancha and European Commission

FEDER Funds (Grant n° POIII1-0159-0054); Comunidad de Madrid (Grant S2010-BMD2308); and the Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno (Grant n° Patrocinio 2013-001). AB: is supported by grant from Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno. ART: is supported by grant from University of Alcalá.

Author Contributions

Conceptualization: CM DVC IDL NRH.

Data curation: MAD NRH.

Formal analysis: CM MAD NRH.

Funding acquisition: IDL NRH.

Investigation: CM AB NRH.

Methodology: CM AB DVC NRH.

Project administration: IDL NRH.

Resources: CM AB ART.

Supervision: IDL NRH.

Validation: AB ART IDL NRH.

Visualization: NRH.

Writing – original draft: NRH.

Writing – review & editing: DVC IDL NRH.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 2015; 136(5):E359–86. doi: [10.1002/ijc.29210](https://doi.org/10.1002/ijc.29210) PMID: [25220842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25220842/).
2. Rick FG, Schally AV. Bench-to-bedside development of agonists and antagonists of luteinizing hormone-releasing hormone for treatment of advanced prostate cancer. *Urologic oncology*. 2015; 33(6):270–4. doi: [10.1016/j.urolonc.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2014.11.006) PMID: [25512159](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25512159/).
3. Samson DJ, Seidenfeld J, Schmitt B, Hasselblad V, Albertsen PC, Bennett CL, et al. Systematic review and meta-analysis of monotherapy compared with combined androgen blockade for patients with advanced prostate carcinoma. *Cancer*. 2002; 95(2):361–76. doi: [10.1002/ncr.10647](https://doi.org/10.1002/ncr.10647) PMID: [12124837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12124837/).
4. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & therapeutics*. 2013; 140(3):223–38. doi: [10.1016/j.pharmthera.2013.07.003](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.07.003) PMID: [23859952](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23859952/).
5. Saad F, Fizazi K. Androgen Deprivation Therapy and Secondary Hormone Therapy in the Management of Hormone-sensitive and Castration-resistant Prostate Cancer. *Urology*. 2015; 86(5):852–61. doi: [10.1016/j.urology.2015.07.034](https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.07.034) PMID: [26282624](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26282624/).
6. Karantanos T, Corn PG, Thompson TC. Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene*. 2013; 32(49):5501–11. doi: [10.1038/onc.2013.206](https://doi.org/10.1038/onc.2013.206) PMID: [23752182](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23752182/); PubMed Central PMCID: [PMC3908870](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3908870/).
7. Hirano D, Okada Y, Minei S, Takimoto Y, Nemoto N. Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy. *European urology*. 2004; 45(5):586–92; discussion 92. doi: [10.1016/j.euro.2003.11.032](https://doi.org/10.1016/j.euro.2003.11.032) PMID: [15082200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15082200/).
8. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, Arora V, Rickman D, Ayala G, et al. Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2014; 20(11):2846–50. doi: [10.1158/1078-0432.CCR-13-3309](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3309) PMID: [24727321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24727321/); PubMed Central PMCID: [PMC4040316](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4040316/).

9. Wyatt AW, Gleave ME. Targeting the adaptive molecular landscape of castration-resistant prostate cancer. *EMBO molecular medicine*. 2015; 7(7):878–94. doi: [10.15252/emmm.201303701](https://doi.org/10.15252/emmm.201303701) PMID: [25896606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25896606/); PubMed Central PMCID: [PMC4520654](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4520654/).
10. Cussenot O, Villette JM, Valeri A, Cariou G, Desgrandchamps F, Cortesse A, et al. Plasma neuroendocrine markers in patients with benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma. *The Journal of urology*. 1996; 155(4):1340–3. PMID: [8632569](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8632569/).
11. Isshiki S, Akakura K, Komiya A, Suzuki H, Kamiya N, Ito H. Chromogranin a concentration as a serum marker to predict prognosis after endocrine therapy for prostate cancer. *The Journal of urology*. 2002; 167(2 Pt 1):512–5. PMID: [11792908](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11792908/).
12. Hvamstad T, Jordal A, Hekmat N, Paus E, Fossa SD. Neuroendocrine serum tumour markers in hormone-resistant prostate cancer. *European urology*. 2003; 44(2):215–21. PMID: [12875941](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12875941/).
13. Sun Y, Niu J, Huang J. Neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *American journal of translational research*. 2009; 1(2):148–62. PMID: [19956427](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19956427/); PubMed Central PMCID: [PMC2776313](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2776313/).
14. Abrahamsson PA. Neuroendocrine cells in tumour growth of the prostate. *Endocrine-related cancer*. 1999; 6(4):503–19. PMID: [10730904](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10730904/).
15. Terry S, Beltran H. The many faces of neuroendocrine differentiation in prostate cancer progression. *Frontiers in oncology*. 2014; 4:60. doi: [10.3389/fonc.2014.00060](https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00060) PMID: [24724054](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24724054/); PubMed Central PMCID: [PMC3971158](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3971158/).
16. Sauer CG, Roemer A, Grobholz R. Genetic analysis of neuroendocrine tumor cells in prostatic carcinoma. *The Prostate*. 2006; 66(3):227–34. doi: [10.1002/pros.20338](https://doi.org/10.1002/pros.20338) PMID: [16173029](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16173029/).
17. Bang YJ, Pirnia F, Fang WG, Kang WK, Sartor O, Whitesell L, et al. Terminal neuroendocrine differentiation of human prostate carcinoma cells in response to increased intracellular cyclic AMP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994; 91(12):5330–4. PMID: [8202489](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8202489/); PubMed Central PMCID: [PMC43988](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC43988/).
18. Cox ME, Deeble PD, Lakhani S, Parsons SJ. Acquisition of neuroendocrine characteristics by prostate tumor cells is reversible: implications for prostate cancer progression. *Cancer research*. 1999; 59(15):3821–30. PMID: [10447001](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10447001/).
19. Deeble PD, Murphy DJ, Parsons SJ, Cox ME. Interleukin-6- and cyclic AMP-mediated signaling potentiates neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate tumor cells. *Molecular and cellular biology*. 2001; 21(24):8471–82. doi: [10.1128/MCB.21.24.8471-8482.2001](https://doi.org/10.1128/MCB.21.24.8471-8482.2001) PMID: [11713282](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11713282/); PubMed Central PMCID: [PMC100010](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC100010/).
20. Gutierrez-Canas I, Juarranz MG, Collado B, Rodriguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, et al. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *The Prostate*. 2005; 63(1):44–55. doi: [10.1002/pros.20173](https://doi.org/10.1002/pros.20173) PMID: [15468165](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15468165/).
21. Shen R, Dorai T, Szaboles M, Katz AE, Olsson CA, Buttyan R. Transdifferentiation of cultured human prostate cancer cells to a neuroendocrine cell phenotype in a hormone-depleted medium. *Urologic oncology*. 1997; 3(2):67–75. PMID: [21227062](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21227062/).
22. Saffig R, Klumperman J. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009; 10(9):623–35. doi: [10.1038/nm2745](https://doi.org/10.1038/nm2745) PMID: [19672277](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19672277/).
23. Fukuda M. Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *The Journal of biological chemistry*. 1991; 266(32):21327–30. PMID: [1939168](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1939168/).
24. Eskelinen EL. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular aspects of medicine*. 2006; 27(5–6):495–502. doi: [10.1016/j.mam.2006.08.005](https://doi.org/10.1016/j.mam.2006.08.005) PMID: [16973206](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16973206/).
25. Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lullmann-Rauch R, et al. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 2000; 406(6798):902–6. doi: [10.1038/35022595](https://doi.org/10.1038/35022595) PMID: [10972293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10972293/).
26. Nishino I, Fu J, Tanji K, Yamada T, Shimojo S, Koori T, et al. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy and myopathy (Danon disease). *Nature*. 2000; 406(6798):906–10. doi: [10.1038/35022604](https://doi.org/10.1038/35022604) PMID: [10972294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10972294/).
27. Endo Y, Furuta A, Nishino I. Danon disease: a phenotypic expression of LAMP-2 deficiency. *Acta neuropathologica*. 2015; 129(3):391–8. doi: [10.1007/s00401-015-1385-4](https://doi.org/10.1007/s00401-015-1385-4) PMID: [25589223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25589223/).
28. Eskelinen EL, Cuervo AM, Taylor MR, Nishino I, Blum JS, Dice JF, et al. Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic*. 2005; 6(11):1058–61. doi: [10.1111/j.1600-0854.2005.00337.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00337.x) PMID: [16190986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16190986/).
29. Cuervo AM, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research*. 2014; 24(1):92–104. doi: [10.1038/cr.2013.153](https://doi.org/10.1038/cr.2013.153) PMID: [24281265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24281265/); PubMed Central PMCID: [PMC3879702](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3879702/).

30. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, et al. Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. *Autophagy*. 2013; 9(3):403–9. doi: [10.4161/aut.23002](https://doi.org/10.4161/aut.23002) PMID: [23291500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23291500/); PubMed Central PMCID: [PMC3590259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3590259/).
31. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, et al. Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. *Autophagy*. 2013; 9(8):1167–71. doi: [10.4161/aut.24880](https://doi.org/10.4161/aut.24880) PMID: [23839276](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23839276/); PubMed Central PMCID: [PMC3748189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3748189/).
32. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature reviews Clinical oncology*. 2011; 8(9):528–39. doi: [10.1038/nrclinonc.2011.71](https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.71) PMID: [21587219](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21587219/).
33. Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO journal*. 2015; 34(7):856–80. doi: [10.15252/emboj.201490784](https://doi.org/10.15252/emboj.201490784) PMID: [25712477](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25712477/); PubMed Central PMCID: [PMC4388596](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4388596/).
34. Farrow JM, Yang JC, Evans CP. Autophagy as a modulator and target in prostate cancer. *Nature reviews Urology*. 2014; 11(9):508–16. doi: [10.1038/nrurol.2014.196](https://doi.org/10.1038/nrurol.2014.196) PMID: [25134829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25134829/); PubMed Central PMCID: [PMC4415606](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4415606/).
35. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(43):15545–50. doi: [10.1073/pnas.0506580102](https://doi.org/10.1073/pnas.0506580102) PMID: [16199517](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16199517/); PubMed Central PMCID: [PMC1239896](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1239896/).
36. Wright ME, Tsai MJ, Aebersold R. Androgen receptor represses the neuroendocrine transdifferentiation process in prostate cancer cells. *Molecular endocrinology*. 2003; 17(9):1726–37. doi: [10.1210/me.2003-0031](https://doi.org/10.1210/me.2003-0031) PMID: [12775765](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12775765/).
37. Cuervo AM, Dice JF. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science*. 1996; 273(5274):501–3. PMID: [8662539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8662539/).
38. Luzio JP, Pryor PR, Bright NA. Lysosomes: fusion and function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8(8):622–32. doi: [10.1038/nrm2217](https://doi.org/10.1038/nrm2217) PMID: [17637737](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17637737/).
39. Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW, et al. Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cellular immunology*. 1996; 171(1):10–9. doi: [10.1006/cimm.1996.0167](https://doi.org/10.1006/cimm.1996.0167) PMID: [8660832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8660832/).
40. Damaghi M, Tafreshi NK, Lloyd MC, Sprung R, Estrella V, Wojtkowiak JW, et al. Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane. *Nature communications*. 2015; 6:8752. doi: [10.1038/ncomms9752](https://doi.org/10.1038/ncomms9752) PMID: [26658462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26658462/); PubMed Central PMCID: [PMC4682176](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4682176/).
41. Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy*. 2012; 8(4):445–544. PMID: [22966490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22966490/); PubMed Central PMCID: [PMC3404883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3404883/).
42. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016; 12(1):1–222. doi: [10.1080/15548627.2015.1100356](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1100356) PMID: [26799652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799652/).
43. Gottlieb RA, Andres AM, Sin J, Taylor DP. Untangling autophagy measurements: all fluxed up. *Circulation research*. 2015; 116(3):504–14. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.303787](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303787) PMID: [25634973](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25634973/); PubMed Central PMCID: [PMC4313387](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4313387/).
44. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology*. 2001; 142(11):4795–805. doi: [10.1210/endo.142.11.8467](https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8467) PMID: [11606446](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11606446/).
45. Xie S, Lin HK, Ni J, Yang L, Wang L, di Sant'Agnes PA, et al. Regulation of interleukin-6-mediated PI3K activation and neuroendocrine differentiation by androgen signaling in prostate cancer LNCaP cells. *The Prostate*. 2004; 60(1):61–7. doi: [10.1002/pros.20048](https://doi.org/10.1002/pros.20048) PMID: [15129430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15129430/).
46. Morell C, Bort A, Vara D, Ramos-Torres A, Rodriguez-Henche N, Diaz-Laviada I. The cannabinoid WIN 55,212–2 prevents neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2016. doi: [10.1038/pcan.2016.19](https://doi.org/10.1038/pcan.2016.19) PMID: [27324222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27324222/).
47. Appelqvist H, Waster P, Kagedal K, Ollinger K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *Journal of molecular cell biology*. 2013; 5(4):214–26. doi: [10.1093/jmcb/mjt022](https://doi.org/10.1093/jmcb/mjt022) PMID: [23918283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23918283/).
48. Fehrenbacher N, Bastholm L, Kirkegaard-Sorensen T, Rafn B, Bottzauw T, Nielsen C, et al. Sensitization to the lysosomal cell death pathway by oncogene-induced down-regulation of lysosome-associated membrane proteins 1 and 2. *Cancer research*. 2008; 68(16):6623–33. doi: [10.1158/0008-5472.CAN-08-0463](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0463) PMID: [18701486](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18701486/).

49. Furuta K, Ikeda M, Nakayama Y, Nakamura K, Tanaka M, Hamasaki N, et al. Expression of lysosome-associated membrane proteins in human colorectal neoplasms and inflammatory diseases. *The American journal of pathology*. 2001; 159(2):449–55. doi: [10.1016/S0002-9440\(10\)61716-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61716-6) PMID: [11485903](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11485903/); PubMed Central PMCID: [PMC1850563](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1850563/).
50. Saha T. LAMP2A overexpression in breast tumors promotes cancer cell survival via chaperone-mediated autophagy. *Autophagy*. 2012; 8(11):1643–56. doi: [10.4161/auto.21654](https://doi.org/10.4161/auto.21654) PMID: [22874552](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22874552/); PubMed Central PMCID: [PMC3494593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3494593/).
51. Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnik J, Macian F, Varticovski L, et al. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Science translational medicine*. 2011; 3(109):109ra17. doi: [10.1126/scitranslmed.3003182](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003182) PMID: [22089453](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22089453/); PubMed Central PMCID: [PMC4000261](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4000261/).
52. Ibrahim-Hashim A, Cornell HH, Abrahams D, Lloyd M, Bui M, Gillies RJ, et al. Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice. *The Journal of urology*. 2012; 188(2):624–31. doi: [10.1016/j.juro.2012.03.113](https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.03.113) PMID: [22704445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22704445/); PubMed Central PMCID: [PMC3694604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3694604/).
53. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: a dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 36:121–9. doi: [10.1016/j.semcdb.2014.08.006](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.08.006) PMID: [25158238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25158238/).
54. Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, et al. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature*. 2010; 465(7300):942–6. doi: [10.1038/nature09076](https://doi.org/10.1038/nature09076) PMID: [20526321](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20526321/); PubMed Central PMCID: [PMC2920749](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2920749/).
55. Matsuda-Lennikov M, Suizu F, Hirata N, Hashimoto M, Kimura K, Nagamine T, et al. Lysosomal interaction of Akt with Phafin2: a critical step in the induction of autophagy. *PLoS one*. 2014; 9(1):e79795. doi: [10.1371/journal.pone.0079795](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079795) PMID: [24416124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24416124/); PubMed Central PMCID: [PMC3885392](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3885392/).
56. Noguchi M, Hirata N, Suizu F. The links between AKT and two intracellular proteolytic cascades: ubiquitination and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1846(2):342–52. doi: [10.1016/j.bbcan.2014.07.013](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.07.013) PMID: [25109892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25109892/).
57. Fan QW, Cheng C, Hackett C, Feldman M, Houseman BT, Nicolaides T, et al. Akt and autophagy cooperate to promote survival of drug-resistant glioma. *Sci Signal*. 2010; 3(147):ra81. doi: [10.1126/scisignal.2001017](https://doi.org/10.1126/scisignal.2001017) PMID: [21062993](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21062993/); PubMed Central PMCID: [PMC3001107](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3001107/).
58. Chang PC, Wang TY, Chang YT, Chu CY, Lee CL, Hsu HW, et al. Autophagy pathway is required for IL-6 induced neuroendocrine differentiation and chemoresistance of prostate cancer LNCaP cells. *PLoS one*. 2014; 9(2):e88556. doi: [10.1371/journal.pone.0088556](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088556) PMID: [24551118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24551118/); PubMed Central PMCID: [PMC3925144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3925144/).
59. Zhu Y, Liu C, Cui Y, Nadiminty N, Lou W, Gao AC. Interleukin-6 induces neuroendocrine differentiation (NED) through suppression of RE-1 silencing transcription factor (REST). *The Prostate*. 2014; 74(11):1086–94. doi: [10.1002/pros.22819](https://doi.org/10.1002/pros.22819) PMID: [24819501](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24819501/).
60. Lapuk AV, Wu C, Wyatt AW, McPherson A, McConeghy BJ, Brahmhatt S, et al. From sequence to molecular pathology, and a mechanism driving the neuroendocrine phenotype in prostate cancer. *The Journal of pathology*. 2012; 227(3):286–97. doi: [10.1002/path.4047](https://doi.org/10.1002/path.4047) PMID: [22553170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22553170/); PubMed Central PMCID: [PMC3659819](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3659819/).
61. Manjithaya R, Subramani S. Autophagy: a broad role in unconventional protein secretion? *Trends Cell Biol*. 2011; 21(2):67–73. doi: [10.1016/j.tcb.2010.09.009](https://doi.org/10.1016/j.tcb.2010.09.009) PMID: [20961762](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20961762/); PubMed Central PMCID: [PMC3025270](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3025270/).
62. Ponpuak M, Mandell MA, Kimura T, Chauhan S, Cleyrat C, Deretic V. Secretory autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2015; 35:106–16. doi: [10.1016/j.ceb.2015.04.016](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.016) PMID: [25988755](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988755/); PubMed Central PMCID: [PMC4529791](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4529791/).

