



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

REPROGRAMACIÓN METABÓLICA E INMUNOGÉNICA PARA
MEJORAR LA RESPUESTA ANTITUMORAL EN MELANOMA Y
CÁNCER DE PÁNCREAS

D. Román Martí Díaz

2024



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE
DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

REPROGRAMACIÓN METABÓLICA E INMUNOGENICA PARA
MEJORAR LA RESPUESTA ANTITUMORAL EN MELANOMA Y
CÁNCER DE PÁNCREAS

Autor: D. Román Martí Díaz

Directores: D. José Neptuno Rodríguez López y
D. Luis Sánchez del Campo Ferrer



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Román Martí Díaz

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

REPROGRAMACIÓN METABÓLICA E INMUNOGÉNICA PARA MEJORAR LA RESPUESTA ANTITUMORAL EN MELANOMA Y CÁNCER DE PÁNCREAS

y dirigida por,

D./Dña. José Neptuno Rodríguez López

D./Dña. Luis Sánchez del Campo Ferrer

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 18 de diciembre de 2023

Fdo.: Román Martí Díaz

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

Los estudios llevados a cabo en esta Tesis Doctoral han sido parcialmente financiados por las subvenciones correspondientes a los siguientes Proyectos de Investigación:

- *MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LAS CÉLULAS TUMORALES PARA SU SENSIBILIZACIÓN A LA RADIO E INMUNOTERAPIA*. Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2016-77241-R).

- *REPROGRAMACIÓN EPIGENÉTICA Y METABÓLICA INDUCIDA POR NUEVAS TERAPIAS HIPOMETILANTES COMO APROXIMACIÓN PARA MEJORAR LA RESPUESTA A LA INMUNOTERAPIA DE TUMORES EPITELIALES DE MELANOMA Y MAMA*. Fundación Séneca, Región de Murcia (20809/PI/18).

- *MODULACIÓN DE NUEVOS COMPONENTES DE LA RESPUESTA A ESTRÉS (MITF, TFEB, TFE3) SOBRE LA ACTIVIDAD DEL SISTEMA INMUNE EN MELANOMA*. Fundación Robles Chillida, Región de Murcia (35772).

Román Martí Díaz ha realizado esta Tesis Doctoral financiado por una ayuda competitiva – contrato predoctoral – de la Fundación Séneca (21407/FPI/20), y opta a la Mención de Doctorado Internacional gracias a la estancia realizada en el Hospital Universitario de Oslo (Noruega) durante 3 meses, financiada con una ayuda para estancias externas destinada a los investigadores predoctorales de la Fundación Séneca (21718/EFPI/22).

A mis padres, a mi hermano

CONTENIDO

PUBLICACIONES.....	I
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	XI
ABREVIATURAS	XV
CAPÍTULO 1. RESUMEN	3
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS.....	119
CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN.....	123
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	223
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES.....	231
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	237

PUBLICACIONES

La presente Tesis Doctoral, de acuerdo con el informe correspondiente, autorizado por los Directores de Tesis, la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología y la Comisión General de Doctorado de la Universidad de Murcia, se presenta como compendio de tres artículos publicados en Revistas Científicas. Las referencias completas de los trabajos que constituyen el compendio de la Tesis son las siguientes:

1. Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., Rodríguez-López, J. N., & Sánchez-Del-Campo, L. (2020). Acriflavine, a Potent Inhibitor of HIF-1 α , Disturbs Glucose Metabolism and Suppresses ATF4-Protective Pathways in Melanoma under Non-Hypoxic Conditions. *Cancers*, 13, 102. <https://doi.org/10.3390/cancers13010102>
2. Sánchez-Del-Campo, L., Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Hernández-Caselles, T., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., & Rodríguez-López, J. N. (2021). MITF induces escape from innate immunity in melanoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 40, 117. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8>
3. Montenegro, M. F., Martí-Díaz, R., Navarro, A., Tolvía, J., Sánchez-del-Campo, L., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2023). Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy. *Cell Death & Disease*, 14, 761. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9>

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral también ha dado lugar a las siguientes comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

1. Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Regulación de ADAM10 mediada por MITF en la respuesta inmune contra el melanoma. Póster presentado en: IV Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 11 de noviembre de 2019, Murcia (España).
Abstract disponible en:
<https://jornadaiv.imib.es/jornadaiv/printComunicacion.jsf?id=881>
2. González-Guerrero, R., Martí-Díaz, R., Sánchez-Del-Campo, L., Montenegro, M. F. y Rodríguez-López, J. N. Tea-derived catechins with antitumor properties. Póster presentado en: I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 de octubre de 2020, Murcia (España).
Abstract disponible en:
https://eventos.um.es/_files/_event/_41485/_editorFiles/file/BookOfAbstracts.pdf

3. Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. Effect of metformina on melanoma cells. Póster presentado en: I Symposium on Chemical and Physical Sciences for Young Researchers. 22-23 de octubre de 2020, Murcia (España).
Abstract disponible en:
https://eventos.um.es/_files/_event/_41485/_editorFiles/file/BookOfAbstracts.pdf
4. Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J. y Rodríguez-López, J. N. Control of protein methylation as a novel and efficient epigenetic strategy for the treatment of pancreatic cancer. Póster presentado en: V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 23 de noviembre de 2020, Murcia (España).
Abstract disponible en:
<https://jornadav.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=941>
5. Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1 dimerization, decreases MITF expression and induces apoptosis in melanoma cells. Póster presentado en: V Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 23 de noviembre de 2020, Murcia (España).
Abstract disponible en:
<https://jornadav.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=951>
6. Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., C.R. Goding, Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Acriflavine targets the MITF/ATF4 axis in melanoma. Póster presentado en: EACR 2021 Virtual Congress: Innovative Cancer Science. 9-12 de junio de 2021.
Abstract disponible en:
<https://nwm.covr.be/cmPortal/searchable/EACR26/config/normal/redirectconfig/normal/redirectConference/EACR2021V#!abstractdetails/0000936720>
7. Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. MITF regula directamente ADAM10 en células de melanoma. Comunicación oral presentada en: VI Jornadas Doctorales 2021. 21-24 de junio de 2021, Murcia (España).
8. Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., T., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. ADAM10 is a direct MITF target gene in melanoma. Póster presentado en: 43º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 19-22 de julio de 2021, Barcelona (España).
Abstract disponible en:
<https://sebbm.es/wp-content/uploads/BOOK-OF-ABSTRACTS-SEBBM-21.pdf>

- 9.** Martí-Díaz, R. MITF regula ADAM10 y modula la respuesta inmune contra el melanoma. Comunicación oral presentada en: III Congreso Interdisciplinar de Jóvenes Investigadores. 23-24 de septiembre de 2021, Murcia (España).
Abstract disponible en:
<https://www.eumed.net/es/libros/libro/actas-jovenes-investigadores>
- 10.** Montenegro, M. F., Martí-Díaz, R., Navarro-Incio A. M., Tolivia-Fernández J., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. A hypomethylating treatment inhibits autophagy in pancreatic cancer cells and induces effective apoptosis. Póster presentado en: XIX Congreso de la Sociedad Española de Biología Celular. 26-29 de octubre de 2021, Madrid (España).
Abstract disponible en:
<https://orexco.congressus.es/xixcongresosebc/s5>
- 11.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. Generation of a CD47 knockout breast cancer cell line to study the role of CD47 during radiotherapy. Póster presentado en: VI Jornadas Científicas del IMIB-Arrixaca. 16 de noviembre de 2021, Murcia (España).
Abstract disponible en:
<https://jornadavi.imib.es/jornadav/printComunicacion.jsf?id=1037>
- 12.** Martí-Díaz, R., González-Guerrero, R., Montenegro, M. F., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Generación de líneas celulares knock-out MITF, TFEB y TFE3 para el estudio de su implicación en la respuesta inmune frente al melanoma. Comunicación oral presentada en: VII Jornadas Doctorales 2022. 4-6 de julio de 2022, Murcia (España).
- 13.** Martí-Díaz, R., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J. N. y Sánchez-Del-Campo, L. Papel de las proteínas MiT/TFE en la respuesta inmune contra el melanoma. Póster presentado en: 44º Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular. 6-9 de septiembre de 2022, Málaga (España).
Abstract disponible en:
https://congresos.sebbm.es/malaga2022/wp-content/uploads/Resumenes_final_3.pdf
- 14.** Martí-Díaz, R., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L. y Rodríguez-López, J. N. Metilación y autofagia en cáncer de páncreas. Comunicación oral presentada en: VIII Jornadas Doctorales 2023. 26-28 de junio de 2023, Murcia (España).
- 15.** Martí-Díaz, R. Formación inicial del profesorado universitario: Aprendizajes y retos formativos. Póster presentado en las I Jornadas sobre formación inicial del profesorado universitario. 5 de julio de 2023, Murcia (España).

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. RESUMEN	3
1.1. RESUMEN	3
1.2. SUMMARY	6
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	11
2.1. CÁNCER.....	11
2.1.1. DEFINICIÓN	11
2.1.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER	11
2.1.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER.....	14
2.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa.....	14
2.1.3.2. Evasión de los supresores de crecimiento	15
2.1.3.3. Resistencia a la muerte celular	18
2.1.3.4. Potencial de replicación ilimitado	21
2.1.3.5. Inducción de angiogénesis.....	23
2.1.3.6. Invasión y metástasis.....	25
2.1.3.7. Desregulación del metabolismo energético.....	29
2.1.3.8. Evitar la destrucción por el sistema inmune	33
2.1.3.9. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica	35
2.1.3.10. Senescencia celular.....	37
2.1.3.11. Inestabilidad genética y mutaciones	38
2.1.3.12. Inflamación mediada por el tumor	39
2.1.3.13. Reprogramación epigenética no mutacional	40
2.1.3.14. Polimorfismos microbianos	42
2.2. CÁNCER DE PIEL	44
2.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA	44
2.2.2. MELANOMA	45
2.2.2.1. Melanocitos y melanoma	46
2.2.2.2. Patogénesis del melanoma.....	48
2.2.2.3. Epidemiología.....	49
2.2.2.4. Factores de riesgo	52
2.2.2.5. Bases moleculares del melanoma	55
2.2.2.6. Diagnóstico del melanoma.....	71

2.2.2.7. Clasificación de los estadios del melanoma	73
2.2.2.8. Tratamiento del melanoma	75
2.2.2.9. Importancia del microambiente tumoral, heterogeneidad y plasticidad celular en la resistencia a terapias en melanoma	81
2.2.2.10. Evasión del sistema inmunitario en melanoma	84
2.3. CÁNCER DE PÁNCREAS	90
2.3.1. Células pancreáticas y cáncer de páncreas.....	90
2.3.2. Patogénesis del cáncer de páncreas	92
2.3.3. Epidemiología	94
2.3.4. Factores de riesgo	96
2.3.5. Bases moleculares del cáncer de páncreas.....	97
2.3.6. Diagnóstico.....	103
2.3.7. Clasificación de los estadios del cáncer de páncreas	103
2.3.8. Tratamiento.....	105
2.3.9. Autofagia como mecanismo protector	107
2.3.10. Bloqueo de los ciclos del ácido fólico y de la metionina	110
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	119
CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN	123
4.1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	123
4.1.1. CULTIVOS CELULARES	123
4.1.1.1. Mantenimiento	123
4.1.1.2. Subcultivo	130
4.1.1.3. Crioconservación	130
4.1.1.4. Tratamientos.....	131
4.1.2. MODELOS ANIMALES.....	132
4.1.2.1. El ratón como modelo animal.....	132
4.1.2.2. Mantenimiento de los ratones	134
4.1.2.3. Estudio de tumores primarios y metástasis.....	134
4.1.2.4. Monitorización de tumores primarios y metástasis.....	135
4.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	136
4.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.....	136
4.2.1.1. Tinción con azul tripán.....	136

4.2.1.2. Ensayo con MTT.....	137
4.2.1.3. Tinción de cristal violeta.....	138
4.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS.....	139
4.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA.....	139
4.2.2.2. Ensayo TUNEL.....	140
4.2.3. MICROSCOPIA.....	141
4.2.3.1. Microscopía óptica.....	141
4.2.3.2. Microscopía electrónica.....	144
4.2.4. INMUNOFLUORESCENCIA.....	145
4.2.5. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	146
4.2.6. CITOMETRÍA DE FUJO.....	150
4.2.6.1. Análisis de marcadores mediante citometría de flujo.....	151
4.2.6.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo.....	154
4.2.7. ANÁLISIS DEL METABOLISMO CELULAR.....	155
4.2.8. ENSAYOS DE LUCIFERASA.....	158
4.2.9. MEDIDA DE LA GLUCOSA INTRACELULAR.....	159
4.2.10. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.....	160
4.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	163
4.3.1. DETECCIÓN DE CONTAMINACIONES POR MICOPLASMA.....	163
4.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE BRADFORD.....	163
4.3.3. ELECTROFORESIS.....	165
4.3.3.1. SDS-PAGE.....	165
4.3.4. WESTERN BLOT.....	168
4.3.5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS.....	171
4.3.6. CENTRIFUGACIÓN.....	173
4.3.6.1. Separación de células mononucleares en centrifugación isopícnica.....	174
4.3.7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK.....	175
4.3.8. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.....	176
4.3.9. ENSAYOS ELISA.....	178
4.3.9.1. Cuantificación de SAM y SAH.....	179
4.3.9.2. Cuantificación MIC-A/B.....	180

4.3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA DE PP2A.....	181
4.3.11. CUANTIFICACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS.....	184
4.3.12. MEDIDA DE KRAS ACTIVADO.....	184
4.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	186
4.4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	186
4.4.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico.....	186
4.4.1.2. Extracción y purificación de ARN total.....	187
4.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN.....	189
4.4.3. ANÁLISIS DE CANTIDAD Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	190
4.4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	191
4.4.4.1. PCR convencional.....	192
4.4.4.2. PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o qPCR.....	193
4.4.5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA.....	197
4.4.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).....	198
4.4.7. SOBREEXPRESIÓN TRANSITORIA DE UN GEN.....	202
4.4.8. TRANSFECCIÓN ESTABLE DE ADN.....	204
4.4.9. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN.....	206
4.4.10. SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE MEDIANTE CRISPR/Cas9.....	207
4.4.11. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS MUTANTES.....	214
4.4.12. CLONACIÓN DE ADN EN BACTERIAS.....	215
4.5. TÉCNICAS DE ESTADÍSTICA.....	217
4.5.1. COMPARACIÓN DE DATOS.....	217
4.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN.....	217
4.5.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA.....	218
4.5.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES.....	218
4.5.5. ANÁLISIS DE DATOS DE ChIP-seq.....	219
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	223
5.1. ACRIFLAVINA, UN POTENTE INHIBIDOR DE HIF-1 α , ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y SUPRIME LAS VÍAS PROTECTORAS DE ATF4 EN EL MELANOMA EN CONDICIONES NO HIPÓXICAS.....	223

5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) INDUCE EL ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL MELANOMA	225
5.3. EL BLOQUEO DE LA METILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS RESULTA EN EL DESEQUILIBRIO DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR KRAS Y LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA.....	227
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	231
6.1. CONCLUSIONES	231
6.2. CONCLUSIONS.....	233
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	237

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

CAPÍTULO 1. RESUMEN	3
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN	11
Figura 2.1. Representación del ciclo celular y los complejos ciclina/CDK implicados	16
Figura 2.2. Vía de señalización de la proteína supresora de tumores p53	18
Figura 2.3. Representación del mecanismo de activación molecular de las vías intrínsecas y extrínsecas de muerte celular programada	21
Figura 2.4. Dinámica de la longitud de los telómeros en diversas células a lo largo del tiempo	23
Figura 2.5. Cambio angiogénico que muestra la progresión de hiperplasia a tumor hipervascularizado	25
Figura 2.6. Descripción general de la cascada metastásica	26
Figura 2.7. Características, marcadores y contexto de la transición epitelio-mesénquima	27
Figura 2.8. Efecto Warburg	30
Figura 2.9. Diferencias en el consumo de glucosa entre células normales y cancerosas	32
Figura 2.10. Representación esquemática de los principales puntos de control inmunitarios y de sus inhibidores	35
Figura 2.11. Representación de diversos tipos de diferenciación celular en la patogénesis del cáncer	37
Figura 2.12. Características distintivas del cáncer	43
Figura 2.13. Representación gráfica de los estratos y tipos celulares de la epidermis	45
Figura 2.14. Función de MITF en el proceso de producción de melanina en la piel humana	48
Figura 2.15. Representación gráfica del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma.....	49
Figura 2.16. Datos estimados tanto de muertes como de nuevos casos de melanoma por cada 100000 habitantes, a nivel mundial	50
Figura 2.17. Datos estimados tanto de nuevos casos de cáncer en países más desarrollados como de las tasas de incidencia de melanoma en todo el mundo	51
Figura 2.18. Datos estimados de las tasas de incidencia de melanoma de piel por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel de Europa	51
Figura 2.19. Mutaciones en genes clave y las vías de señalización subsiguientes en el desarrollo del melanoma.....	59
Figura 2.20. Vía de señalización de Notch	60
Figura 2.21. Esquema de la vía Wnt/ β -catenina activada e inhibida	62
Figura. 2.22. Diferentes isoformas de MITF	64
Figura 2.23. Diagrama esquemático de los factores de transcripción que regulan positiva o negativamente el promotor MITF-M y su respuesta a las vías de señalización	65

Figura 2.24. Principales modificaciones postraduccionales de la proteína MITF-M	67
Figura 2.25. Principales funciones biológicas de MITF	68
Figura 2.26. Esquema resumido de las características de la relación de MITF con el sistema inmunitario a nivel transcripcional	71
Figura 2.27. Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma cutáneo maligno	72
Tabla 2.1. Diferentes estadios del melanoma	74
Figura 2.28. Secuencia temporal de las terapias aprobadas por la FDA para el melanoma metastásico.....	76
Figura 2.29. Terapias dirigidas aprobadas por la FDA o en ensayos para el tratamiento del melanoma cutáneo	78
Figura 2.30. Papel de CTLA-4 y PD-1 en la regulación del sistema inmunitario.....	80
Figura 2.31. Modelo de reóstato según la expresión de MITF en melanoma.....	83
Figura 2.32. Inmunoedición a lo largo de la formación y progresión del tumor	86
Figura 2.33. Función del receptor NKG2D en células NK	87
Figura 2.34. Estructura de las proteínas ADAM y ADAMTS humanas que tienen actividad proteolítica	89
Figura 2.35. Tipos de células presentes en el páncreas	92
Figura 2.36. Representación esquemática e histológica del desarrollo gradual del cáncer de páncreas	93
Figura 2.37. Datos estimados de muertes por cáncer, de nuevos casos de cáncer de páncreas y de su incidencia/mortalidad, a nivel mundial	94
Figura 2.38. Datos estimados de las tasas de incidencia de cáncer de páncreas por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel mundial.....	95
Figura 2.39. Función del complejo MRAS-SHOC2-PP1 fosfatasa	98
Figura 2.40. Activación de la proteína KRAS y las vías intracelulares implicadas	100
Tabla 2.2. Diferentes estadios del cáncer de páncreas	104
Figura 2.41. Representación esquemática del proceso de autofagia.....	108
Figura 2.42. Inhibición de KRAS, MEK o ERK induce el flujo autofágico en células cancerosas a través de ULK1	109
Figura 2.43. Representación esquemática de los ciclos del ácido fólico y de la metionina ..	112
Figura 2.44. Estructura molecular del TMCG y TMECG	113
Figura 2.45. El ciclo de la metionina y sus conexiones con diversas rutas metabólicas y de supervivencia celular.....	115
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	119
CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN	123
Figura 4.1. Cabina de flujo laminar, incubadores y depósito de nitrógeno líquido	124
Figura 4.2. Curva de crecimiento teórica para una línea celular continua	129
Figura 4.3. Irradiador de rayos X <i>Andrex SMART 200E</i>	131

Figura 4.4. Ratones C57BL/6 y Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu y Rag2-Il2rg	133
Figura 4.5. Equipo necesario para inmovilizar al ratón y dilatar la vena de su cola	134
Figura 4.6. Imagen obtenida de un ratón con metástasis y sistema de imagen <i>in vivo</i>	135
Figura 4.7. Imagen y esquema de una cámara de Neubauer	136
Figura 4.8. Reacción de la conversión de MTT a Formazano	137
Figura 4.9. Esquema de los principales elementos del kit empleado para la detección de apoptosis mediante ELISA	139
Figura 4.10. Microscopios ópticos invertidos <i>Nikon-Eclipse TE-2000U</i> y <i>Zeiss Axio Observer 7</i>	142
Figura 4.11. Microscopio de barrido láser confocal <i>Leica STELLARIS 8</i>	143
Figura 4.12. Microscopio electrónico de transmisión <i>JEOL 1011</i>	144
Figura 4.13. Diagrama de puntos o “dot plot” con un doble marcaje e histograma que representa la intensidad de fluorescencia de un determinado marcador	151
Figura 4.14. Citómetros de flujo <i>FACSCalibur Cell-Quest</i> y <i>BD LSRFortessa X-20</i>	154
Figura 4.15. Histograma representativo de las diferentes fases del ciclo celular después de la tinción con yoduro de propidio	155
Figura 4.16. Dispositivo <i>Seahorse XFe96 Analyzer</i>	156
Figura 4.17. Fundamento del ensayo empleado para la medida de glucólisis celular	157
Figura 4.18. Esquema del ensayo empleado para medir la captación de glucosa por parte de las células	160
Figura 4.19. Contador de centelleo gamma <i>Wizard2 2480</i>	162
Tabla 4.1. Cálculos para elaboración de la recta patrón de BSA	164
Figura 4.20. Sistema de electroforesis <i>Mini-PROTEAN</i>	166
Figura 4.21. Componentes del sistema empleado para realizar la técnica de Western blot y sentido de migración de las proteínas desde el gel hacia la membrana	169
Figura 4.22. Revelado mediante quimioluminiscencia	171
Figura 4.23. Diagrama del proceso de inmunoprecipitación indirecta con microesferas magnéticas de proteína G	173
Figura 4.24. Aparatos de centrifugación	173
Figura 4.25. Separación de los componentes de una suspensión celular según su densidad mediante la solución de <i>Histopaque-1077</i>	175
Figura 4.26. Análisis por citometría de flujo de la población de células NK antes y después de la purificación	176
Figura 4.27. Lectores de placas <i>SpectraMax 340PC384</i> y <i>FLUOstar Omega</i>	178
Figura 4.28. Diagrama de un ensayo ELISA de tipo competitivo	180
Figura 4.29. Diagrama de un ensayo ELISA de tipo sándwich	181
Figura 4.30. Diagrama del proceso de purificación de ADN	187
Figura 4.31. Diagrama del proceso de extracción y purificación de ARN total	188

Figura 4.32. Esquema del proceso de retrotranscripción y termociclador <i>Mastercycler personal</i>	189
Figura 4.33. Dispositivo <i>NanoDrop 2000</i>	190
Figura 4.34. Diagrama de las etapas secuenciales durante el proceso de PCR	192
Figura 4.35. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR convencional	193
Figura 4.36. Aumento de fluorescencia del compuesto <i>SYBR Green I</i> tras su unión al ADN de doble cadena	194
Figura 4.37. Equipo <i>QuantStudioTM 5 Flex</i> y representación de una curva de amplificación obtenida en una PCR en tiempo real	194
Figura 4.38. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR en tiempo real	197
Figura 4.39. Diagrama de las principales etapas de la inmunoprecipitación de cromatina ..	199
Figura 4.40. Elementos comunes que comparten los plásmidos de expresión	203
Figura 4.41. Diagrama de los principales pasos que se llevan a cabo con el sistema el sistema <i>PiggyBac</i> para integrar una o varias secuencias de ADN en el genoma de la célula	205
Figura 4.42. Diagrama simplificado del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9 ..	210
Figura 4.43. Estructura simplificada de los plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de un gen mediante la técnica de CRISPR/Cas9	211
Tabla 4.2. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de las regiones de unión de los ARNg y para la secuenciación de las mismas por el método de Sanger	214
Figura 4.44. Diagrama de los principales pasos que ocurren con el kit <i>QuikChange II Site-Directed Mutagenesis</i>	215
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	223
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	231
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	237

ABREVIATURAS

2-DG: 2-deoxi-D-glucosa	APC: células presentadoras de antígenos
2DG6P: 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato	APC protein: <i>adenomatous polyposis coli protein</i>
5-FU: 5-fluorouracilo	ARAF: <i>A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
5-mTHF: 5-metilenTHF	ARN: ácido ribonucleico
A: absorbancia	ARNasa: ribonucleasa
A₂₃₀: absorbancia a 230 nm	ARNg: ARN guía
A₂₆₀: absorbancia a 260 nm	ARNi: ARN de interferencia
A₂₈₀: absorbancia a 280 nm	ARNm: ARN mensajero
AA: antimicina A	ASR: tasa estandarizada por edad
ABTS: 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)	ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo
ACTI: área científica y técnica de investigación	ATF2: factor 2 de transcripción activador
ADA: adenosina desaminasa	ATF4: factor 4 de transcripción activador
ADAM: proteína desintegrina y metaloproteasa	ATP: adenosín trifosfato
ADM: metaplasia acinar-ductal	ATPasa: adenosín trifosfatasa
ADN: ácido desoxirribonucleico	Bak: <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
ADNasa: desoxirribonucleasa	Bax: proteína X asociada a Bcl-2
ADNc: ADN copia	Bcl-2: <i>B-cell lymphoma 2</i>
ADP: adenosín difosfato	Bcl-XL: <i>B-cell lymphoma extra large</i>
AdOx: adenosina dialdehído	BH3: dominio 3 homólogo de Bcl-2
AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolasa	bHLH-ZIP: cremallera básica hélice-bucle-hélice de leucina
AJCC: <i>american joint committee on cancer</i>	Bid: dominio de interacción BH3
AKT/PKB: proteína quinasa B	Bim: <i>Bcl-2 interacting mediator of cell death</i>
ALT: alargamiento alternativo de los telómeros	BMI: intensidad promedio de la señal de fondo
ALX3: <i>aristaless-like homeobox 3</i>	BRAF: protooncogén B-Raf
AMPK: proteína quinasa activada por AMP	BRCA1: proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
AMPc: adenosín monofosfato cíclico	
APAF-1: factor 1 activador de proteasa apoptótica	

BRG1: proteína del gen 1 relacionado con brahma

BSA: albúmina de suero bovino

BTLA: atenuador de linfocitos B y T

CAF: fibroblasto asociado al cancer

CAIX: anhidrasa carbónica IX

CAMs: moléculas de adhesión celular

CAR: receptor antígeno quimérico

CBP: proteína de unión a CREB

CCL: ligando de quimioquina (motivo C-C)

CCND1: ciclina D1

CD: *cluster of differentiation*

CDK: quinasa dependiente de ciclina

CDK4: quinasa 4 dependiente de ciclina

CDKN1A: inhibidor de quinasa 1A dependiente de ciclina

CDKN1B: inhibidor de quinasa 1B dependiente de ciclina

CDKN2A: inhibidor de quinasa 2A dependiente de ciclina

CEA: antígeno carcinoembrionario

CEACAM1: Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario 1

ChIP: inmunoprecipitación de cromatina

ChIP-Seq: inmunoprecipitación de cromatina seguida de secuenciación

CK1 α : caseína quinasa 1-alfa

COMTs: catecol-O-metiltransferasas

CPD: dímeros de pirimidina de ciclobutano

CQ: cloroquina

CRAF: *C-RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*

CRE: elemento de respuesta al AMPc

CREB: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc

CRIF: factor de intensidad recíproca del cromógeno

CRISPR/Cas9: sistema de edición del ADN

CRTC: coactivador transcripcional regulado por CREB

CSL: *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1 protein*

Ct: ciclo umbral

Δ Ct: diferencia entre el Ct del gen de estudio y el Ct del gen de referencia

$\Delta\Delta$ Ct: diferencia entre el Δ Ct de la condición experimental control y el Δ Ct de la condición experimental de estudio

CTLA-4: proteína 4 asociada a linfocitos T citotóxicos

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DC: células dendríticas

DCT: dopacromo tautomerasa

DFS: supervivencia libre de enfermedad

DG: 1,2-diacilglicerol

DHF: 7,8-dihidrofolato

DHFR: enzima dihidrofolato reductasa

DIAPH1: *protein 1 diaphanous homolog*

DICER: endorribonucleasa de ARN de doble cadena

DIPY: dipiridamol

DISC: complejo de señalización que induce la muerte

DMEM: medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco

DMSO: dimetilsulfóxido

DNMTs: metiltransferasas de ADN

dNTPs: dextrosirribonucleótidos trifosfato

DPX: dibutilftalato poliestireno xileno

DRS: receptores de muerte

DSB: rotura de doble hebra

dTMP: monofosfato de desoxitimidina

dUMP: monofosfato de desoxiuridina

DVL: *disheveled*

EC1: dominio extracelular 1 de la E-cadherina

ECAR: tasa de acidificación extracelular

ECG: epicatequina galato

ECM: matriz extracelular

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGCG: epigalocatequina galato

EGF: factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico

ELISA: ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas

EMEM: medio de cultivo Eagle mínimo esencial

EMT: transición epitelial-mesenquimal

ENTs: transportadores de nucleósidos

ER: retículo endoplásmico

ERK: quinasa regulada por señales extracelulares

FASL: ligando del antígeno de superficie asociado a FS-7

FD: factor de dilución

FDA: agencia de administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos

FECN: factor de enriquecimiento citosólico nucleosomal

FOXD3: forkhead box D3

FSC: dispersión frontal de la luz

G0: fase G0 del ciclo celular (células quiescentes o senescentes)

G1: fase G1 del ciclo celular

G2: fase G2 del ciclo celular

G6P: glucosa-6-fosfato

G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa

GAPDH: gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GAP: proteína activadora de GTPasa

GCS: gamma-glutamylcisteína sintetasa

GDP: difosfato de guanosina

GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina

GFP: proteína verde fluorescente

GLOBOCAN: observatorio mundial del cáncer

GLUT1: transportador 1 de glucosa

Gly: glicina

GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento

GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3-beta

GTP: trifosfato de guanosina

GTPasa: guanosín trifosfatasa

hBRM: proteína BRM humana

HCQ: hidroxiclороquina

Hcy: homocisteína

HDAC1: histona desacetilasa 1

HDR: reparación dirigida por homología

HEPES: ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

HIF-1: factor 1 inducible por hipoxia

HMT: terapia o tratamiento hipometilante consistente en la administración de TMCG y DIPY

HMTs: metiltransferasas de histonas

HMW: alto peso molecular HSV-1: virus del herpes simple tipo 1

HR: sistema de recombinación homóloga

HRAS: *Harvey rat sarcoma virus*

HRE: elemento de respuesta a hipoxia

HRP: enzima peroxidasa de rábano

HVEM: mediador de entrada de herpesvirus

HVR: región hipervariable

IAPs: inhibidores de las proteínas de la apoptosis

IB: tampón de incubación

IC₅₀: la mitad de la concentración máxima inhibidora

IDO: indoleamina 2, 3-dioxigenasa

IF- α 2b: interferón alfa 2b

IFN: interferón

IFN γ : interferón gamma

IgG: inmunoglobulina G

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleucina

IMIB: instituto murciano de investigación biosanitaria

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IP: ioduro de propidio

IP3: inositol trifosfato

IPMN: neoplasia mucinosa pancreática intraductal

IR: radiación ionizante

IRF4: factor 4 regulador de interferon

ITR: repetición terminal invertida

IVIS: sistema de imagen *in vivo*

JNK: quinasa Jun N-terminal

KIT: *proto-oncogene, receptor tyrosine kinase*

KO: *knockout*

KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten (*Kirsten rat sarcoma virus*)

LAIB: laboratorio de investigación biosanitaria

LB: medio *Luria-Bertani*

LDHA: lactato deshidrogenasa A

LEF: factor potenciador linfoide

LKB1: quinasa hepática 1

LMW: bajo peso molecular

IncARN: ARN largos no codificantes

Luc: luciferasa

MACS: separación magnética de células

MAML: *mastermind-like protein*

MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MAT2A: metionina adenosiltransferasa 2A

MATs: metionina adenosiltransferasas

MC1R: receptor 1 de melanocortina

Mcl-1: proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide 1

MCN: neoplasia quística mucinosa

MCT1: transportador 1 de monocarboxilato

MDM2: *murine double minute 2*

MDM4: *murine doble minute 4*

MDSC: células supresoras derivadas de células mieloides

MEK: quinasa activada por mitógenos que activa a ERK

MET: transición mesenquimal-epitelial

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

miARN: micro ARN

MIC-A/B: molécula de la secuencia A/B relacionada con el polipéptido MHC clase I

MITF: factor de transcripción asociado a microftalmia

MLANA/MART-1: proteína melan-A

MOMP: permeabilización de la membrana externa mitocondrial

MRAS: homólogo del oncogén RAS muscular

MRI: imagen de resonancia magnética

MS: metionina sintasa

α -MSH: hormona estimulante de los melanocitos alfa

MT: metiltransferasas

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa

mTOR: proteína diana de la rapamicina en mamíferos

MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio

MTX: metotrexato

MYC: homólogo celular del oncogén del virus de la mielocitomatosis aviar

NAD: nicotinamida adenina dinucleótida

NAD⁺: nicotín adenín dinucleótido oxidado

NADH: nicotín adenín dinucleótido reducido

NADP⁺: nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado

NADPH: nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido

NCI: instituto nacional de cáncer (Estados Unidos)

NECD: dominio extracelular de Notch

NFAT: factor nuclear de células T activadas

NICD: dominio intracelular de Notch

NK: *natural killer*

NKG2D: *natural killer group 2D*

NF1: neurofibromina

NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas

NHEJ: sistema de unión de extremos no homólogos

NO: óxido nítrico

Noxa: activador de la NADPH oxidasa

NRAS: *neuroblastoma ras viral oncogene homolog*

OC-2: *onecut 2*

OCR: tasa de consumo de oxígeno

OS: supervivencia general

OxPhos: fosforilación oxidativa

p14^{ARF}: *alternative reading frame p14*

p15^{INK4b}: inhibidor B de CDK4

p16^{INK4a}: inhibidor A de CDK4

p21^{CIP1}: *CDK-interacting protein 1*

p27^{KIP1}: inhibidor de CDKN1B

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida

PAM: motivo adyacente protoespaciador (secuencia de reconocimiento)

PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática

PARP: polimerasa de poli-(ADP-ribosa)

PAX3: *paired box 3*

PBS: tampón fosfato salino

PBS-T: PBS al 0,05% (v/v) de Tween-20

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PD-1: proteína 1 de muerte celular programada

PDAC: adenocarcinoma ductal pancreático

PDH: piruvato deshidrogenasaPKA: proteína quinasa A

PD-L1: ligando 1 de muerte programada

PD-L2: ligando 2 de muerte programada

PER: tasa de salida de protones

PET: tomografía de emisión de positrones

PGC1 α : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*

PI3P: fosfatidilinositol 3-fosfato

PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa

PIP2: fosfatidilinositol-4,5-difosfato

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PKA: proteína quinasa A

PKC: proteína quinasa C

PLC: fosfolipasa C

PMEL17: proteína premelanosoma

POMC: proopiomelanocortina

PP2A: proteína fosfatasa 2A

pRB: proteína del retinoblastoma

PRMTs: metiltransferasas de proteínas

PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina

PTM: modificación post-traducciona

Puma: modulador de apoptosis regulado positivamente por p53

PVDF: fluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR cuantitativa

RAF: quinasa responsable del “fibrosarcoma rápidamente acelerado” (*rapidly accelerated fibrosarcoma*)

RAL-A/B: proteína A/B similar a RAS

RAS: gen del “virus del sarcoma de rata” (*rat sarcoma*)

RB1: proteína del retinoblastoma 1

RBD: dominio de unión a la proteína RAS

REDECAN: red española de registros de cáncer

RFP: proteína roja fluorescente

RMPI: medio de cultivo *Roswell Park Memorial Institute*

RMTs: metiltransferasas de ARN

ROI: región de interés

Rot: rotenona

RT: retrotranscripción o transcripción inversa

RTK: receptor de tirosina quinasa

S: fase S del ciclo celular

SAH: S-adenosilhomocisteína

SAM: S-adenosilmetionina

SASP: fenotipo secretor asociado a la senescencia

SB: tampón de muestra desnaturizante

SBF: suero bovino fetal

SCF: factor de células madre

SCT: Sección de Cultivo de Tejidos

SD: desviación estándar

SDS: dodecilsulfato sódico

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecilsulfato sódico

Ser: serina

SHMT: serina hidroximetiltransferasa

SIK: quinasa inducible por sal

siRNA: pequeño ARN de interferencia

SIRT1: histona desacetilasa dependiente de NAD

SMAC: segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias

SMAD: *mothers against decapentaplegic*

SOS: factor de intercambio de nucleótidos de guanina de especificidad dual (*son of sevenless*)

SOX10: *sry-related HMg-Box gene 10*

SSB: rotura de hebra sencilla

SSC: dispersión lateral de la luz

STAT3: transductor de señal y activador de la transcripción 3

Suv39h1: histona-lisina N-metiltransferasa

T: transmitancia

TAC: tomografía axial computarizada

TAE: tampón Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.5

TAM: macrófagos asociados a tumores

TBS: solución salina tamponada con Tris

TCA cycle: ciclo del ácido tricarboxílico

TCF: factor de células T

TCGA: base de datos del genoma del cáncer

TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

TERT: transcriptasa inversa de telomerasa

TFE3: factor de transcripción de unión al potenciador IGHM 3

TFEB: factor de transcripción EB

TFEC: factor de transcripción EC

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

THF: 5,6,7,8-tetrahidrofolato

Thr: treonina

TIL: linfocitos infiltrantes tumorales

TLS: estructuras linfoides terciarias

T_m: temperatura de fusión

TMCG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-catequina

TMECG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina

TNF: factor de necrosis tumoral

TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa

TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral

TP53: proteína tumoral p53

TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF

TRPM1: *transient receptor potential cation channel subfamily M member 1*

TS: timidilato sintasa

T-VEC: *talimogene laherparepvec*

TYR: tirosinasa

TYRP1: proteína 1 relacionada con la tirosinasa 1

UM: Universidad de Murcia

UCSC: Universidad de California en Santa Cruz

ULK1: proteína quinasa específica de serina/treonina (*Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1*)

UV: ultravioleta

UV-VIS: ultravioleta-visible

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial

Wnt: *wingless-related integration site*

XIAP: proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma

Capítulo 1

Resumen

*«El éxito no es la victoria, sino todo lo que
has peleado por ganar»*

Rafael Nadal

CAPÍTULO 1. RESUMEN

1.1. RESUMEN: REPROGRAMACIÓN METABÓLICA E INMUNOGÉNICA PARA MEJORAR LA RESPUESTA ANTITUMORAL EN MELANOMA Y CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer es una enfermedad compleja que ha desafiado tanto a la medicina como a la ciencia durante décadas, y cuyo tratamiento constituye uno de los principales retos de la salud pública a nivel mundial. El melanoma y el cáncer de páncreas muestran una alta capacidad de metástasis, así como una baja respuesta a los tratamientos actuales, lo que da lugar a elevadas tasas de mortalidad. Por tanto, el descubrimiento de nuevas moléculas o estrategias terapéuticas que eviten su progresión y aumenten la calidad y esperanza de vida de los pacientes con este tipo de cánceres representa una prioridad en la investigación oncológica.

El metabolismo y el sistema inmune desempeñan funciones esenciales en la respuesta antitumoral, constituyendo un contexto prometedor para mejorar las estrategias de tratamiento y aumentar las tasas de supervivencia en pacientes con cáncer. El metabolismo tumoral normalmente se caracteriza por una alta absorción de glucosa y una producción excesiva de lactato. Estos cambios metabólicos permiten a las células cancerosas prosperar en un entorno hipóxico y proporcionan los bloques de construcción necesarios para su rápido crecimiento y proliferación. Otra de la característica metabólica de las células tumorales es el control de diferentes procesos celulares como la autofagia y la resistencia a drogas a través de la regulación de la metilación de proteínas. En este sentido, nuestro grupo de investigación ha desarrollado terapias hipometilantes con actividad antitumoral sobre distintos tipos de cáncer, lo que indica que el control de la metilación de las proteínas también podría ser una estrategia novedosa y eficiente para el tratamiento del cáncer. Por otro lado, el sistema inmune juega un papel crucial en la detección y destrucción de células cancerosas. Las células inmunitarias, como los linfocitos T y las células NK, son capaces de reconocer y atacar a las células tumorales. Sin embargo, los tumores pueden desarrollar mecanismos para evadir la respuesta inmunológica, creando un desafío importante en el tratamiento del cáncer.

De acuerdo con esto, el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue estudiar los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo, control de la metilación de proteínas y respuesta inmune antitumoral para diseñar nuevas estrategias terapéuticas efectivas frente a melanoma y cáncer de páncreas.

Durante esta Tesis Doctoral, se utilizaron diferentes modelos experimentales, incluyendo líneas celulares de melanoma y cáncer de páncreas, así como modelos animales de ratón. Se emplearon una amplia variedad de técnicas bioquímicas, como Western blot, cuantificación de proteínas, ensayos ELISA o inmunoprecipitación de proteínas; técnicas de biología celular, como ensayos de viabilidad, de apoptosis, de luciferasa, inmunohistoquímica, microscopía, citometría de flujo, aislamiento de células NK o cuantificación de parámetros relacionados con el metabolismo; y técnicas de biología molecular, como PCR cuantitativa, clonación de ADN, inmunoprecipitación de cromatina, silenciamiento génico transitorio, silenciamiento génico estable mediante CRISPR/Cas9 o sobreexpresión de determinados genes. Además, los datos obtenidos mediante estas técnicas fueron analizados con las pruebas estadísticas adecuadas.

Los principales resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral han quedado reflejados en la literatura científica y se pueden sintetizar en tres grandes bloques:

Por un lado, observamos que la acriflavina, un potente inhibidor de la dimerización de HIF-1 α , provoca un cambio en el metabolismo de las células de melanoma en condiciones de normoxia. El tratamiento de las células de melanoma con acriflavina resulta en una reducción de la disponibilidad de glucosa y en la supresión del efecto Warburg. Además, al bloquear la fosforilación de AKT y RSK2, la acriflavina también interrumpe vías protectoras necesarias para sobrevivir en situaciones de estrés oxidativo. En este sentido, la acriflavina promueve la degradación de ATF4 y reduce la expresión de MITF, un regulador clave en el desarrollo de melanocitos y un oncogén en el melanoma. Estos resultados indican que la inhibición de HIF-1 α en el melanoma mediante la acriflavina podría representar una novedosa estrategia para el tratamiento de esta enfermedad, independientemente de la presencia de hipoxia en el tumor.

Por otro lado, se estudió el papel del factor de transcripción MITF en la respuesta inmune anti-melanoma. Demostramos que MITF regula ADAM10, una proteasa fundamental para el reconocimiento de las células de melanoma por parte de las células NK. En consecuencia, MITF puede controlar si las células de melanoma son eliminadas eficazmente por las células NK o escapan a su vigilancia. También comprobamos que MITF tiene una doble función en la regulación de la respuesta inmunitaria contra el melanoma, ya que además de suprimir la muerte celular mediada por células NK mediante el control de ADAM10, es capaz de activar la respuesta mediada por los linfocitos T. Estos resultados destacan cómo la actividad de MITF puede modificar la respuesta inmune al melanoma, con implicaciones importantes para las terapias inmunológicas en este tipo de cáncer.

Por último, evaluamos cómo la metilación de proteínas regula el proceso de autofagia basal que utilizan las células de cáncer de páncreas con mutaciones en *KRAS* para sobrevivir y crecer. Al inhibir la metilación de proteínas mediante un tratamiento hipometilante (HMT), observamos una disminución de la autofagia y una activación del estrés del retículo endoplásmico. Esto es debido a una alteración en la señalización de *KRAS*, inactivando parcialmente ERK y activando en exceso la ruta PI3K/AKT-mTORC1. Además, la combinación HMT impidió la activación de CRAF al modificar el complejo formado por SHOC2, MRAS y PP1. La inactivación de PP2A también bloqueó la autofagia al prevenir la activación de ULK1 y restaurar la retención citoplasmática de los factores de transcripción MiT/TFE. Estos resultados evidencian que el tratamiento con HMT podría ser una estrategia terapéutica efectiva contra el cáncer de páncreas al inhibir la autofagia y prevenir la resistencia a los inhibidores de *KRAS*.

En general, los estudios realizados en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto el papel fundamental de los procesos de metilación de proteínas, metabolismo celular y respuesta inmune antitumoral en la patología del cáncer y en el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de tumores de páncreas y melanoma.

1.2. SUMMARY: METABOLIC AND IMMUNOGENIC REPROGRAMMING TO IMPROVE ANTITUMOUR RESPONSE IN MELANOMA AND PANCREATIC CANCER

Cancer is a complex disease that has posed a persistent challenge to the medical and scientific communities for numerous decades. The treatment of cancer is widely acknowledged as one of the most significant global public health issues. Melanoma and pancreatic cancer exhibit a high metastatic potential and low response rates to current treatments, leading to significant mortality. As such, the investigation and identification of new molecules or therapeutic methods that can impede the advancement of these cancers and improve the quality of life and life expectancy for patients is an indispensable priority in oncology research.

Metabolism and the immune system play crucial roles in the antitumour response, offering a promising setting to enhance treatment strategies and increase cancer patient survival. Tumour metabolism is typically characterised by elevated glucose uptake and excessive lactate production. These metabolic alterations enable cancer cells to grow and multiply rapidly in a hypoxic environment by providing them with essential building blocks. Another metabolic feature of tumour cells is the regulation of various cellular processes including autophagy and drug resistance through protein methylation. In this sense, our research group has developed hypomethylating therapies with antitumour activity on different types of cancer, which indicates that the control of protein methylation could offer a promising and effective approach for cancer treatment. Furthermore, the immune system plays a crucial role in the identification and elimination of cancer cells. Specialised immune cells, such as T lymphocytes and NK cells, can recognise and combat malignant tumours. Unfortunately, tumours can develop mechanisms to escape the immune response, which is a major hurdle in cancer treatment.

Accordingly, the main objective of this Doctoral Thesis was to study the molecular processes associated with metabolism, control of protein methylation and antitumour immune response to develop efficient therapeutic strategies against melanoma and pancreatic cancer.

Throughout this Doctoral Thesis, a variety of experimental models were utilised, including melanoma and pancreatic cancer cell lines, as well as mouse animal models. A wide range of biochemical techniques were employed, including Western blot, protein quantification, ELISA assays, or protein immunoprecipitation; alongside cell biology techniques such as viability, apoptosis, and luciferase assays, immunohistochemistry, microscopy, flow cytometry, NK cell isolation, or quantification of metabolism-related

parameters. Besides, molecular biology techniques such as qPCR, DNA cloning, chromatin immunoprecipitation, transient gene silencing, stable gene silencing by CRISPR/Cas9, or overexpression of specific genes were used. The acquired data by these techniques were analysed with appropriate statistical tests.

The key findings of this Doctoral Thesis are documented in the scientific literature and can be categorised into three main sections:

First, we observed that acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1 α dimerization, alters the metabolism of melanoma cells in normoxic conditions. Acriflavine treatment reduces glucose availability and suppresses the Warburg effect in melanoma cells. Moreover, acriflavine disrupts important protective pathways essential for surviving oxidative stress through the inhibition of AKT and RSK2 phosphorylation. As a result, acriflavine promotes ATF4 degradation and decreases the expression of MITF, a crucial regulator of melanocyte development and an oncogene in melanoma. These results indicate that the inhibition of HIF-1 α in melanoma by acriflavine could represent a novel strategy for the treatment of this disease, regardless of the presence of hypoxia in the tumour.

Second, we investigated the function of transcription factor MITF in the immune response against melanoma. Our study demonstrates that MITF controls ADAM10, a protease essential for the recognition of melanoma cells by NK cells. Thus, MITF can determine whether melanoma cells are eliminated by NK cells or escape surveillance. We also show that MITF has a dual role in regulating the immune response against melanoma. Besides inhibiting NK cell-mediated cell death through ADAM10 regulation, MITF can stimulate the T-cell-mediated response. These findings emphasize the capacity of MITF to alter the immune response to melanoma, with important implications for immunotherapy in this cancer.

Finally, we evaluated the influence of protein methylation on the basal autophagy process utilized by pancreatic cancer cells with *KRAS* mutations, allowing them to survive and proliferate. When using a hypomethylating treatment (HMT) to inhibit protein methylation, we discovered a reduction in autophagy and the induction of stress in the endoplasmic reticulum. This is a result of an alteration of the *KRAS* pathway, leading to partial inactivation of ERK and amplification of the PI3K/AKT-mTORC1 pathway. Furthermore, the HMT combination impeded CRAF activation through modification the complex formed by SHOC2, MRAS and PP1. Autophagy was also blocked by inactivating PP2A, which prevented ULK1 activation and re-established the cytoplasmic retention of the MITF/TFE transcription factors. These results reveal that HMT treatment

could be an effective therapeutic strategy against pancreatic cancer by inhibiting autophagy and preventing resistance to KRAS inhibitors.

Overall, this Doctoral Thesis highlights the central role of protein methylation processes, cell metabolism, and the immune response in cancer pathology. It also explores the potential for novel therapeutic approaches in the treatment of pancreatic cancer and melanoma.

Capítulo 2

Introducción

«Todas las cosas negativas, la presión, los obstáculos, los desafíos, son una oportunidad para crecer»

Kobe Bryant

CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN

2.1. CÁNCER

2.1.1. DEFINICIÓN

El término “cáncer” ha sido definido de varias maneras. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) lo identifica como un grupo extenso de enfermedades que pueden originarse en casi cualquier parte del cuerpo. Estas enfermedades se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células anormales, que se propagan más allá de sus límites normales y pueden invadir tejidos cercanos, además de diseminarse a otros órganos. Este último proceso se conoce como metástasis y es la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer. El Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de Estados Unidos utiliza una definición muy parecida, donde establece que los tumores malignos o cancerosos se distinguen por su capacidad invasiva (metástasis), a diferencia de los tumores benignos, que pueden alcanzar un tamaño considerable pero no son capaces de infiltrarse en tejidos adyacentes ni se diseminan a otros lugares. Por último, según la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC), el término "cáncer" engloba más de 200 tipos de enfermedades distintas. Aunque las células comparten características de multiplicación y propagación descontroladas, desde el punto de vista de su origen, desarrollo y tratamiento, podrían considerarse enfermedades independientes.

2.1.2. BASES MOLECULARES DEL CÁNCER

La aparición y progresión de un tumor ocurre principalmente, aunque no exclusivamente, debido a cambios en el material genético de las células. La mayoría de los tumores se originan a partir de la expansión de una única célula somática que ha acumulado diversas alteraciones genéticas, lo que resulta en su transformación en una célula tumoral. Sin embargo, un pequeño número de cánceres están relacionados con mutaciones en las células germinales, lo que causa síndromes hereditarios de predisposición al cáncer. Tradicionalmente, se han identificado tres categorías de genes cuya alteración es fundamental para el desarrollo del cáncer: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN (Pon & Marra, 2015).

Genética del cáncer: oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del ADN

En las células tumorales, se observa una gran cantidad de mutaciones genéticas, pero solo un pequeño conjunto de estas mutaciones contribuye realmente a la

patogénesis del cáncer. Estas mutaciones, que afectan a las tres categorías de genes mencionadas anteriormente, se conocen como mutaciones *driver* o conductoras. Son llamadas así porque otorgan a la célula portadora una ventaja en términos de crecimiento y lideran la transformación hacia la neoplasia. Junto a estas mutaciones, también se presentan otras mutaciones denominadas *passenger* o pasajeras. Estas mutaciones no ofrecen ninguna ventaja selectiva y surgen como resultado de la alta tasa de división celular en los tumores y de los defectos en los sistemas de reparación del ADN que presentan las células tumorales. El estudio de las mutaciones conductoras es crucial para el desarrollo de terapias dirigidas contra las proteínas que con frecuencia se encuentran mutadas en los tumores (Zhang et al., 2014).

Los oncogenes se generan por alteración de genes que normalmente regulan el crecimiento y la proliferación celular, conocidos como protooncogenes. El término "oncogén" está directamente relacionado con el concepto de mutación de ganancia de función. Las mutaciones de ganancia de función son aquellas que causan la sobreactividad o activación constitutiva de una proteína. Estas mutaciones pueden manifestarse a través de translocaciones, amplificaciones génicas o mutaciones puntuales que afectan a los dominios de regulación de la proteína. Por lo general, estas mutaciones son dominantes, lo que significa que la alteración de un solo alelo es suficiente para conferir una ventaja selectiva a la célula y promover el desarrollo de fenotipos tumorales (Pon & Marra, 2015).

Los genes supresores de tumores son genes que normalmente inhiben la proliferación o diferenciación celular o promueven la apoptosis, y su inactivación contribuye al desarrollo de tumores. Las alteraciones genéticas que causan su inactivación suelen ser mutaciones de pérdida de función. Estas mutaciones pueden incluir inserciones, deleciones, mutaciones que generan un codón de parada prematuro que produce formas truncadas de la proteína, o mutaciones que cambian la secuencia de residuos clave para la actividad de la proteína. A diferencia de las mutaciones de ganancia de función que afectan a los oncogenes, las mutaciones de pérdida de función son generalmente recesivas, lo que significa que se requiere la afectación de ambos alelos para que se manifieste su efecto. Sin embargo, en algunos casos se puede observar haploinsuficiencia, donde la inactivación de un alelo es suficiente para proporcionar una ventaja de crecimiento a la célula debido a que la actividad del alelo restante no es suficiente para cumplir la función supresora. En los tumores humanos, también es común encontrar que estos genes estén silenciados mediante mecanismos epigenéticos (Lee & Muller, 2010).

Los genes de reparación del ADN desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del genoma. La tasa de mutación espontánea en una célula no es suficiente para explicar la probabilidad de desarrollar cáncer a lo largo de la vida. Los defectos en los sistemas de reparación del ADN aumentan de manera significativa las tasas de mutación, lo que contribuye en gran medida al proceso de oncogénesis (Hoeijmakers, 2001). Al igual que los genes supresores de tumores, los genes de reparación del ADN también se ven afectados por mutaciones de pérdida de función y por el silenciamiento epigenético (Friedberg, 2003).

Hipótesis del doble golpe de Knudson: mutaciones en células somáticas y mutaciones en línea germinal

La mayoría de los casos de cáncer ocurren de forma esporádica, lo que significa que no existen factores hereditarios que aumenten la probabilidad de desarrollar la enfermedad. En estos casos, el cáncer suele manifestarse en edades avanzadas como resultado de la acumulación gradual de mutaciones somáticas a lo largo del tiempo, desde el estado de embrión hasta la edad adulta. Sin embargo, hay un pequeño porcentaje de individuos (entre un 5-10%) en los que la aparición del cáncer está estrechamente relacionada con mutaciones heredadas que aumentan la susceptibilidad de padecer esta enfermedad (Garber & Offit, 2005). Derivado de la hipótesis de Knudson, esto se conoce como cáncer hereditario, donde los individuos tienen una probabilidad mucho mayor que la población general de desarrollar cáncer.

En 1971, Alfred Knudson propuso la hipótesis del doble golpe (*two-hit hypothesis*) con respecto al gen supresor de tumores *RB1*, lo cual posteriormente se demostró aplicable a otros genes de esta categoría y contribuyó a la comprensión de los síndromes de predisposición al cáncer (Knudson, 1971).

En esta hipótesis, se postula la necesidad de que el gen *RB1* debe ser completamente inactivado para que se desarrolle el retinoblastoma, un tipo de cáncer en la retina que afecta principalmente a niños. La teoría de Knudson se basa en la existencia de dos eventos mutacionales para el desarrollo de la enfermedad. Así pues, si se produce un primer evento (primer *hit*) en el que se hereda una copia mutada del gen, solo se necesitaría una mutación adicional (segundo *hit*) para la pérdida total de su función, lo que resultaría en la aparición temprana del cáncer, explicando así su mayor incidencia en niños y la presentación bilateral en muchos casos. En este sentido, si no se hereda ninguna copia mutada, el proceso de ocurrencia de las dos mutaciones requeriría más tiempo, lo que resultaría en la aparición tardía del tumor y sería menos probable que afecte ambos ojos.

Alteraciones epigenéticas

El cáncer no solo se caracteriza por ser una enfermedad genética, sino que también es considerado una enfermedad epigenética. Se han observado alteraciones epigenéticas en todos los tipos de cáncer humano y en todas las etapas de su desarrollo, sin modificar la secuencia de nucleótidos del ADN. Estas alteraciones pueden observarse como patrones anormales de metilación del ADN, patrones alterados de modificaciones postraduccionales (PTM) de las histonas y cambios en la composición y/o la organización de la cromatina. Los cambios epigenéticos pueden ocurrir antes de las alteraciones genéticas durante la formación del tumor y desempeñar un papel de *driver* o conductoras de la enfermedad. En este sentido, el reconocimiento de un componente epigenético en la tumorigénesis, o la existencia de un "epigenoma" del cáncer, ha abierto nuevas oportunidades para la comprensión, detección, tratamiento y prevención del cáncer (Baylin & Jones, 2016).

2.1.3. CARACTERÍSTICAS DISTINTIVAS DEL CÁNCER

Actualmente, no se ha logrado explicar por completo el origen del proceso cancerígeno debido a la compleja naturaleza de la enfermedad en sí. Sin embargo, a través de la investigación realizada a lo largo de los años, se han identificado una serie de características o marcadores comunes en la mayoría de los cánceres, que incluyen cambios moleculares, bioquímicos y celulares adquiridos por las células cancerosas durante el desarrollo tumoral. En el año 2000, en un enfoque inicial para buscar estas *hallmarks* o marcas distintivas, se identificaron seis procesos celulares cuya adopción por parte de las células tumorales permitiría el desarrollo de tumores, y que son comunes en la mayoría de los cánceres humanos (Hanahan & Weinberg, 2000):

2.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa

Las células normales requieren señales mitogénicas o de crecimiento para cambiar de un estado de inactividad a una proliferación activa. Sin embargo, se ha observado que las células tumorales tienen la capacidad de reducir su dependencia de estas señales externas para iniciar el proceso de proliferación. Esta capacidad se explica mediante tres estrategias principales: producción interna de señales de crecimiento por medio de un mecanismo llamado señalización autocrina; activación de manera constante las vías de señalización que responden a dichas señales; o supresión de los mecanismos de "apagado" (retroalimentación negativa) que normalmente atenúan la señalización proliferativa y evitan el aumento excesivo de esas señales. Mientras que la división celular en las células normales no cancerosas está rigurosamente controlada,

en las células cancerosas, estos procesos están desregulados debido a alteraciones en las proteínas que los controlan, lo que resulta en un mayor crecimiento y división celular dentro del tumor.

Un ejemplo concreto de esto es el alto porcentaje de los melanomas en humanos que presentan mutaciones activadoras en la proteína BRAF, lo que resulta en una señalización constante a través de la ruta de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK, *mitogen-activated protein kinase*) (Davies et al., 2002). De la misma manera, en la mayoría de los casos de cáncer pancreático destacan las alteraciones genéticas que afectan al gen *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma virus*) (Vincent et al., 2011). Las mutaciones activadoras de las oncoproteínas RAS impiden que su actividad GTPasa intrínseca funcione correctamente, lo que resulta en una activación constante de la proteína y, en consecuencia, de la ruta de MAPK. Otro ejemplo lo constituye la proteína fosfatasa PTEN, que contrarresta los efectos de la quinasa PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*) al degradar su producto, el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP3, *phosphatidylinositol 3-phosphate*). La inactivación de PTEN impide que la vía de señalización de PI3K/Akt se interrumpa adecuadamente, lo que favorece la tumorigénesis (Papa & Pandolfi, 2019).

2.1.3.2. Evasión de los supresores de crecimiento

Las células regulan la división celular no solo a través de señales que promueven el crecimiento, sino también mediante señales que inhiben su proliferación. Estas señales supresoras del crecimiento pueden inducir paradas temporales o permanentes en el ciclo celular. En el caso de paradas temporales, las células pueden entrar en un estado de quiescencia o de reposo (G0) que se mantiene hasta que reciben nuevas señales que les permiten reingresar al estado proliferativo. Por otro lado, existen programas específicos que controlan la salida permanente del ciclo celular y generalmente están relacionados con la diferenciación celular, donde las células adquieren fenotipos específicos y no proliferativos (Hanahan & Weinberg, 2000). Muchos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumores que se inactivan de diferentes formas en los diversos tipos de cáncer. Los dos supresores de tumores alterados con más frecuencia en las células cancerosas son las proteínas asociadas al retinoblastoma (pRb) y p53, que actúan como nodos centrales en dos vías de señalización importantes que regulan las decisiones celulares de proliferación o, alternativamente, activan programas de senescencia y apoptosis (Sherr & McCormick, 2002).

Vía supresora de pRb

La proteína Rb (pRb), un supresor tumoral crucial en el control negativo del ciclo celular y la progresión del cáncer, desempeña un papel significativo en el bloqueo de la entrada en la fase S y el crecimiento celular en un importante punto de control G1. La proteína Rb reprime la transcripción de genes necesarios para la transición de la fase G1 a la fase S al unirse directamente al dominio de transactivación del factor de transcripción E2F, formando un complejo Rb-E2F que se une a los promotores de los genes de la fase S y suprime su transcripción. Además, la proteína Rb contribuye a la represión génica al interactuar con proteínas responsables de la remodelación de la cromatina, como hBRM, BRG1, HDAC1 y Suv39h1 (Giacinti & Giordano, 2006).

La señalización que promueve la proliferación celular estimula la expresión de ciclinas y activa las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, *cyclin-dependent kinases*). Estas quinasas fosforilan a pRb y provocan su separación de E2F, lo que permite la expresión de genes que estaban previamente reprimidos. La fosforilación de pRb es iniciada por los complejos de ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6 en la mitad de la fase G1, y es finalizada por el complejo de ciclina E/CDK2 poco antes de la transición a la fase S. Por otro lado, la señalización que suprime el crecimiento celular, así como el daño en el ADN, induce la expresión de inhibidores de las CDKs, lo que mantiene a pRb en su forma activa y unida a E2F. Entre estos inhibidores se encuentran p15, p16, p21 y p27 (**Figura 2.1**).

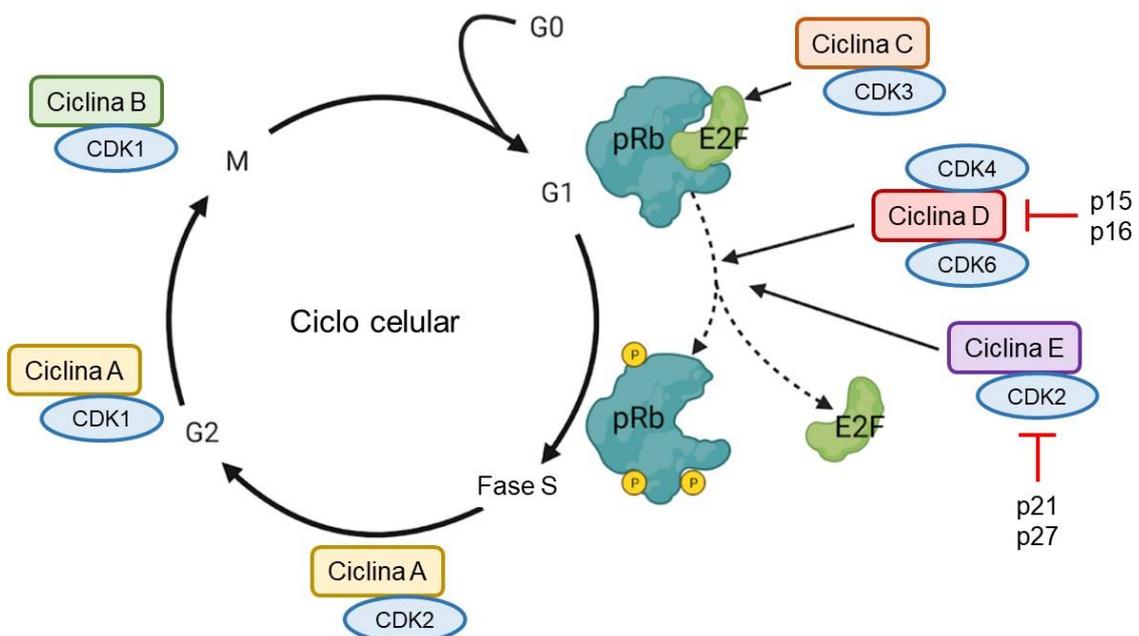


Figura 2.1. Representación del ciclo celular y los complejos ciclina/CDK implicados. CDK: quinasa dependiente de ciclina, E2F: factor de transcripción E2F, pRb: proteína del retinoblastoma. Imagen basada en un esquema de Giacinti & Giordano, 2006.

En los tumores, es común que se produzca una interrupción de la vía de la proteína Rb, lo que permite que las células sean insensibles a las señales que normalmente detendrían la entrada al ciclo celular, dando lugar a una proliferación celular persistente.

Vía supresora de p53

TP53 es el gen que codifica la proteína p53, que desempeña un papel crucial en la integración de la señalización intracelular y en la toma de decisiones sobre el destino de la célula. La proteína p53 puede detener el avance del ciclo celular en respuesta al daño en el ADN o en condiciones desfavorables para la proliferación, como niveles subóptimos de nucleótidos, glucosa u oxígeno. También puede intervenir cuando hay una deficiencia en la señalización proliferativa o un exceso de señalización oncogénica. Si el daño en el ADN no se repara o las condiciones normales no se restablecen, p53 activa el proceso de apoptosis.

En condiciones normales, los niveles de p53 se mantienen bajos debido a su continua degradación a través del proteasoma. El complejo MDM2/MDM4 ubiquitina a p53 y marca su degradación en el proteasoma. A su vez, p53 promueve la transcripción del gen *MDM2*, estableciendo así un circuito de retroalimentación negativa que bloquea la señalización a través de esta vía cuando p53 se activa y se acumula (Zhang & Xiong, 2001).

Cuando p53 se estabiliza, se forma un tetrámero que se une al ADN y estimula la transcripción de los genes que están bajo su control. Según el entorno celular, p53 induce la expresión de genes que detienen el ciclo celular, como *CDKN1A* (p21), genes proapoptóticos como *PUMA* o *BAX*, o genes relacionados con la senescencia celular, metabolismo y ferroptosis (**Figura 2.2**).

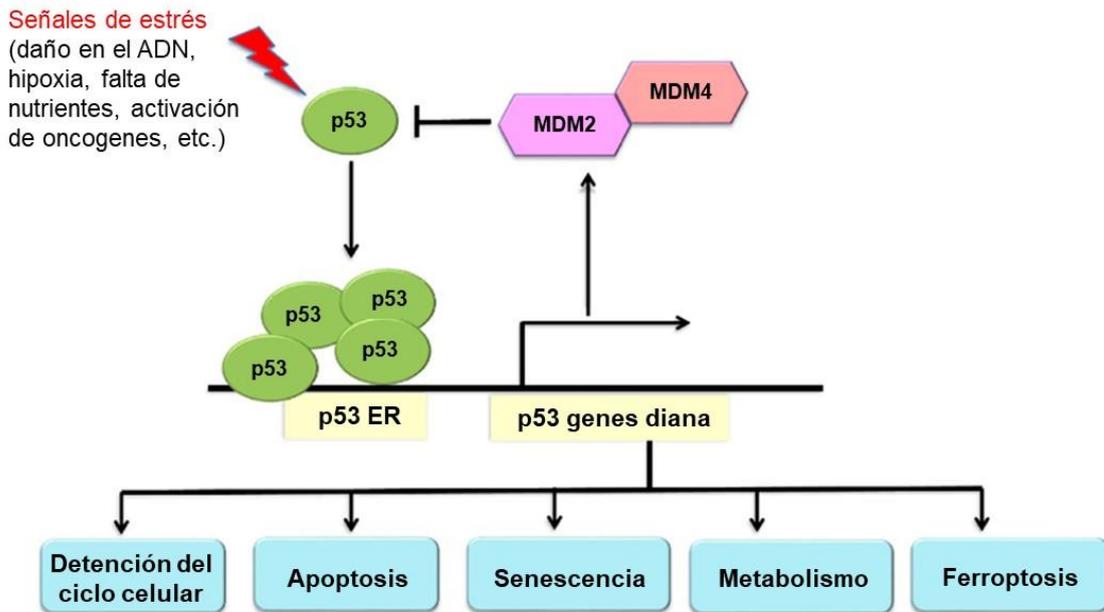


Figura 2.2. Vía de señalización de la proteína supresora de tumores p53. p53 ER: Elemento de respuesta (o secuencia de reconocimiento) de p53. Imagen traducida de Liu et al., 2020.

2.1.3.3. Resistencia a la muerte celular

Además de su capacidad para aumentar la tasa de proliferación mediante cambios en el ciclo celular o en la señalización por factores de crecimiento, las células tumorales pueden lograr un crecimiento descontrolado al inhibir los mecanismos de apoptosis.

La apoptosis, un tipo de muerte celular programada, es un proceso mediante el cual las células se autodestruyen de manera controlada. En el cuerpo humano, todas las células poseen un programa apoptótico que puede ser activado por señales específicas. Durante la apoptosis, las células experimentan una reducción en su volumen, se retraen sus prolongaciones celulares y adquieren una forma redondeada. El citoesqueleto se desintegra, la cromatina se condensa y el núcleo se fragmenta. En etapas avanzadas de la apoptosis, se forman pequeñas vesículas de membrana llamadas cuerpos apoptóticos, que luego son eliminados por células fagocíticas. En general, el proceso de apoptosis está diseñado para preservar la integridad celular, evitando la liberación del contenido celular al exterior y previniendo una respuesta inflamatoria excesiva que podría dañar las células y tejidos cercanos (Wani et al., 2023).

A nivel fisiológico, la apoptosis puede ser desencadenada como respuesta a diversos tipos de estrés o anomalías celulares, como la acumulación de daño en el ADN, así como por una señalización proliferativa insuficiente o excesiva. En el caso de las células tumorales, estas suelen acumular daño en el ADN debido a su alta tasa de proliferación

y/o a mutaciones en los genes responsables de la reparación del ADN. Para que una población de células tumorales pueda expandirse, es necesario que se disponga de mecanismos que eviten la activación de la apoptosis en respuesta al estrés (Hanahan & Weinberg, 2000).

La maquinaria apoptótica se puede clasificar en componentes reguladores y componentes efectores. Según los tipos de componentes reguladores involucrados, se pueden distinguir dos vías apoptóticas diferentes: la vía intrínseca, que recibe y procesa información dentro de la célula, y la vía extrínseca, que responde a señales externas inductoras de apoptosis (**Figura 2.3**). En general, la vía intrínseca está más relacionada con la protección contra la oncogénesis. Ambas vías terminan con la activación de una caspasa iniciadora: la caspasa 9 en la vía intrínseca y la caspasa 8 en la vía extrínseca. Las caspasas son una familia de enzimas que realizan cortes en residuos de ácido aspártico, conocidas como caspasas o cisteína-aspartato proteasas. Las caspasas iniciadoras facilitan el procesamiento proteolítico y la activación de las caspasas efectoras, que posteriormente degradan los sustratos asociados a la progresión de la apoptosis, incluyendo estructuras subcelulares, orgánulos y cromatina.

La mayoría de las señales que desencadenan la apoptosis convergen en la mitocondria, donde la liberación del citocromo c actúa como una potente señal inductora de apoptosis. La familia de proteínas Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) es la responsable de regular la liberación del citocromo c. Entre las proteínas proapoptóticas de esta familia se encuentran Bax, Bak, Bid y Bim, mientras que Bcl-2, Bcl-X_L y Mcl-1 son proteínas antiapoptóticas. Bax y Bak se encuentran anclados a la membrana externa de la mitocondria. Los inhibidores de apoptosis, como Bcl-2, ejercen su función al unirse a estas proteínas y prevenir su actividad. Cuando Bax y Bak están activos, inducen la formación de poros en la membrana mitocondrial (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) y la consiguiente pérdida de integridad, lo que resulta en la liberación del citocromo c. Esta liberación marca el inicio de la formación del apoptosoma, un complejo que consiste en el citocromo c, siete monómeros de APAF-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) y ATP, y que facilita la activación de la caspasa 9, que es una caspasa iniciadora. Bax, Bak y Bcl-2 comparten en su estructura un motivo denominado BH3, un dominio de interacción entre proteínas. Dentro de la familia Bcl-2 existe un subgrupo de proteínas llamadas "*BH3-only*" que, a diferencia de Bax, Bak o Bcl-2, contienen únicamente un motivo BH3. Estas proteínas *BH3-only* están asociadas a diferentes sensores de estrés en la célula y pueden estimular directamente a otras proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2 o interferir con la función antiapoptótica de las proteínas de esta misma familia (Czabotar et al., 2014).

Hay diversos sensores celulares que realizan su función mediante la participación de estas proteínas. Un ejemplo de ello es p53, que supervisa el daño en el ADN y, además de iniciar la apoptosis al inducir directamente la expresión de Bax, también puede hacerlo a través de la inducción de las proteínas proapoptóticas *BH3-only*, Noxa y Puma (Roufayel et al., 2022).

Además de la liberación del citocromo c, la apoptosis también puede ser desencadenada mediante la unión de un ligando extracelular a un receptor de muerte, lo que se conoce como vía extrínseca (**Figura 2.3**). Algunos de los mecanismos más conocidos y significativos involucran a la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNFR, *tumor necrosis factor receptor*). Por ejemplo, la unión del ligando FAS al receptor de FAS, la unión del TNF α al receptor TNF-R1 y la unión del ligando TRAIL (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) a los receptores TRAIL 1 y 2 (TRAILR1/R2), que llevan a la activación de la caspasa 8 iniciadora.

Las células tumorales tienen la capacidad de desarrollar resistencia a la apoptosis mediante diversas estrategias, que se pueden clasificar en general como disminución de la actividad de reguladores proapoptóticos o hiperactivación de reguladores antiapoptóticos. Una de las estrategias más comunes es la pérdida de la actividad de p53, lo que resulta en una disminución de la capacidad de inducir apoptosis en respuesta al daño en el ADN, así como en presencia de anomalías como la hipoxia o la señalización oncogénica. En la vía intrínseca de la apoptosis, también puede observarse la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 o la inhibición de la proteína APAF-1, entre otros mecanismos. Por otro lado, en la vía extrínseca, se puede producir la pérdida de expresión o función de los receptores de muerte debido a mutaciones o alteraciones en el control de metilación celular, así como también la disminución de la expresión de la caspasa 8. Además, la activación de las caspasas efectoras puede ser bloqueada por la presencia de inhibidores de caspasas conocidos como IAPs (*inhibitors of apoptosis proteins*) (Pistritto et al., 2016).

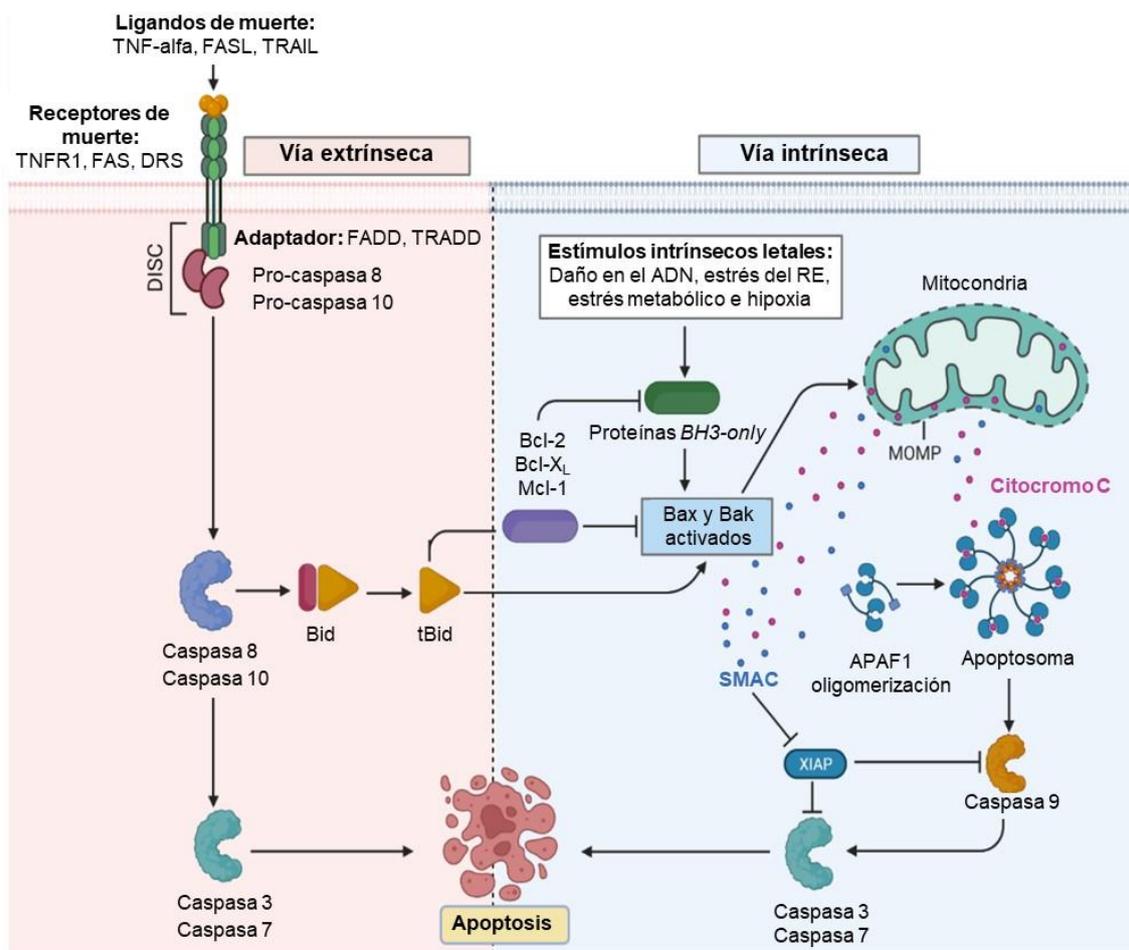


Figura 2.3. Representación del mecanismo de activación molecular de las vías intrínsecas y extrínsecas de muerte celular programada. APAF-1: factor 1 activador de proteasa apoptótica, Bak: Antagonista homólogo de Bcl-2, Bax: Bcl-2 asociada a proteína X, Bid: dominio de interacción BH3, DISC: complejo de señalización inductor de muerte, DRS: receptores de muerte, FASL: ligando de antígeno de superficie asociado a FS-7, Mcl-1: proteína de diferenciación de células de leucemia mieloide, MOMP: permeabilización de la membrana externa mitocondrial, RE: retículo endoplasmático, SMAC: segundo activador de caspasa derivado de mitocondrias, tBid: fragmento del dominio de interacción BH3, TNF: factor de necrosis tumoral, TNFR1: receptor 1 del factor de necrosis tumoral, TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF, XIAP: proteína inhibidora de la apoptosis ligada al cromosoma X. Imagen traducida de Wani et al., 2023.

2.1.3.4. Potencial de replicación ilimitado

Los estudios de Hayflick evidenciaron que las células en cultivo tienen una capacidad replicativa limitada, ya que después de un cierto número de divisiones detienen su crecimiento (Hayflick, 1997). Esto es debido a que las células de mamífero poseen un programa interno que restringe su proliferación, conocido como senescencia (Shay &

Wright, 2005). Sin embargo, la pérdida de actividad de las proteínas supresoras de tumores pRb y p53 permite a las células seguir dividiéndose durante algunas generaciones adicionales hasta que ingresan a una segunda fase denominada crisis (**Figura 2.4**). Durante esta etapa, se produce una muerte celular masiva, desórdenes cromosómicos como fusiones y, ocasionalmente (1 de cada millón), puede surgir una célula que adquiere la capacidad de multiplicarse de manera ilimitada, lo cual se conoce como inmortalización (Akincilar et al., 2016).

Entre las décadas de los 80 y 90, se descubrió un mecanismo para calcular el número de divisiones celulares que implica a los telómeros de los cromosomas. La longitud de los telómeros es el factor determinante en la cantidad de ciclos de división que una célula puede experimentar. Los telómeros están compuestos por una secuencia corta de 6 pares de bases (TTAGGG) que se repite múltiples veces y se sitúan en los extremos de los cromosomas. En cada ciclo de división celular, los telómeros se acortan aproximadamente entre 50 y 100 pares de bases debido a la incapacidad de las polimerasas de ADN para replicar completamente los extremos 3' de los cromosomas durante la fase S. De este modo, el número de divisiones celulares se determina por la pérdida progresiva del ADN telomérico. A medida que los ciclos de replicación se suceden, los telómeros se acortan gradualmente, lo que conduce a la pérdida de su capacidad para proteger el ADN cromosómico de fusiones entre cromosomas. Esta situación resulta en desórdenes cromosómicos que provocan la crisis celular.

No obstante, en las células cancerosas, se observa un mantenimiento de los telómeros debido principalmente a la sobreexpresión de la enzima telomerasa (**Figura 2.4**), la cual agrega repeticiones del hexanucleótido TTAGGG en los extremos de los cromosomas. Un alto porcentaje de tumores humanos, aproximadamente un 85%, presenta una sobreexpresión de la enzima telomerasa (Akincilar et al., 2016). Este mecanismo asegura que los telómeros mantengan una longitud por encima de un umbral crítico, evitando así la activación de las barreras que limitan la proliferación celular, como la senescencia y la crisis celular o apoptosis. Alternativamente, los tumores también pueden mantener la longitud de los telómeros mediante el mecanismo conocido como ALT (*alternative lengthening of telomeres*), el cual implica un proceso de recombinación entre cromosomas. En consecuencia, las células tumorales, además de generar señales de proliferación y evadir las señales supresoras de crecimiento y apoptosis, necesitan mecanismos para evitar el acortamiento de los telómeros y así poder replicarse más allá de los límites establecidos.

Numerosos investigadores, como Leão y colaboradores (Leão et al., 2018), sugieren que, durante la oncogénesis, el acortamiento de los telómeros es un evento primario que facilita la acumulación de alteraciones en el genoma. Defectos en las vías de señalización de la apoptosis o la senescencia, como la pérdida de actividad de p53 o pRb, pueden permitir que las células sobrevivan a pesar del daño acumulado en el ADN. Posteriormente, una de estas células adquiere la capacidad de expresar la telomerasa y se expande clonalmente de forma indefinida, conservando todas las mutaciones presentes en su genoma.

Además del acortamiento de los telómeros, la senescencia también puede ser inducida por una señalización oncogénica excesiva, altos niveles de estrés oxidativo y la acumulación de daño en el ADN. Todas estas señales tienen en común la inducción de p21 a través de la vía de p53, y de manera paralela, la inducción de p16. La senescencia se propone como un mecanismo protector contra el desarrollo de neoplasias (Dodig et al., 2019).

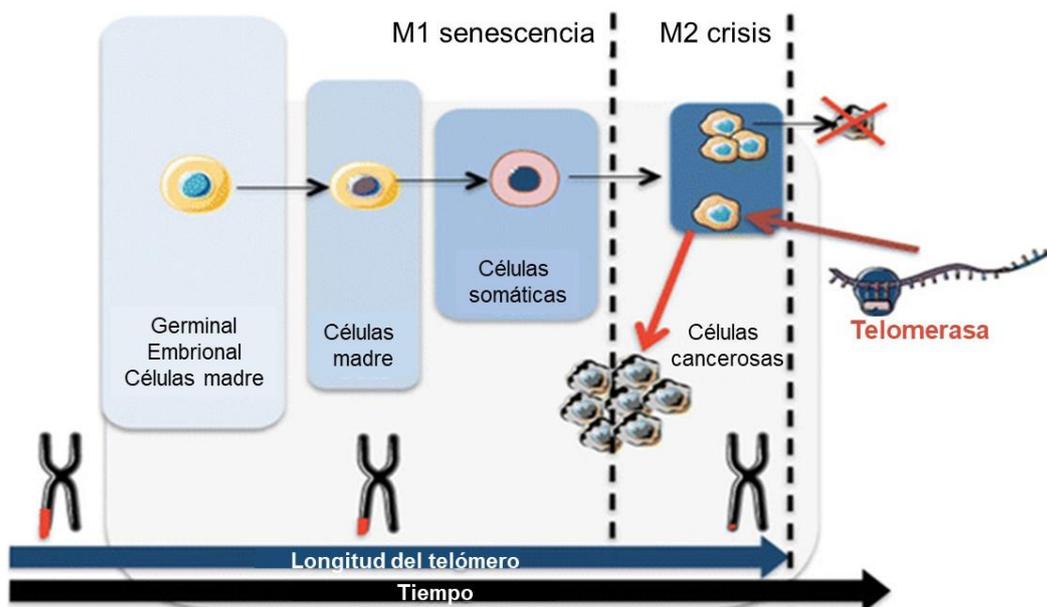


Figura 2.4. Dinámica de la longitud de los telómeros en diversas células a lo largo del tiempo. Imagen traducida de Leão et al., 2018.

2.1.3.5. Inducción de angiogénesis

En los adultos, la formación de nuevos vasos sanguíneos es un evento que generalmente no ocurre en condiciones fisiológicas normales. Durante la etapa temprana del desarrollo embrionario, se establece una red vascular mediante procesos de vasculogénesis y angiogénesis. La vasculogénesis implica la formación de nuevos

vasos a partir de células progenitoras endoteliales, mientras que la angiogénesis implica la creación de vasos a partir de una red vascular preexistente. Estos procesos están regulados por múltiples factores, siendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*) uno de los principales (Jafari Nivlouei et al., 2021).

De la misma forma que las células normales, las células tumorales también requieren oxígeno y nutrientes que solo pueden obtenerse a través de la proximidad a los capilares sanguíneos. Aunque los tejidos normales en adultos tienen una capacidad angiogénica limitada, los tumores necesitan inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos para mantener su alta tasa de proliferación. Sin embargo, este crecimiento anormal provoca que los vasos sanguíneos formados presenten características inmaduras que afectan a su funcionalidad. En consecuencia, estas deficiencias en el funcionamiento de los vasos sanguíneos tumorales tienen efectos significativos en el microambiente del tumor y pueden dar lugar a situaciones como hipoxia, reducción en la infiltración y actividad de las células del sistema inmunitario, así como un mayor riesgo de diseminación metastásica (Carmeliet & Jain, 2011).

A este proceso por el cual el tumor adquiere la capacidad para inducir nuevos vasos sanguíneos se le conoce como "cambio hacia un fenotipo angiogénico" (**Figura 2.5**) y ocurre debido a un desequilibrio en los niveles de factores inductores e inhibidores. Antes de este cambio, los tumores carecen de vasos sanguíneos y su crecimiento está limitado a un diámetro de aproximadamente 1-2 mm, en un equilibrio entre proliferación y apoptosis. Después del cambio, los tumores pueden crecer de manera exponencial debido a la formación de nuevos vasos sanguíneos que les proporcionan soporte nutricional. En este sentido, se ha observado que la angiogénesis se induce de manera temprana durante el desarrollo tumoral, incluso en lesiones premalignas y displasias (Baeriswyl & Christofori, 2009).

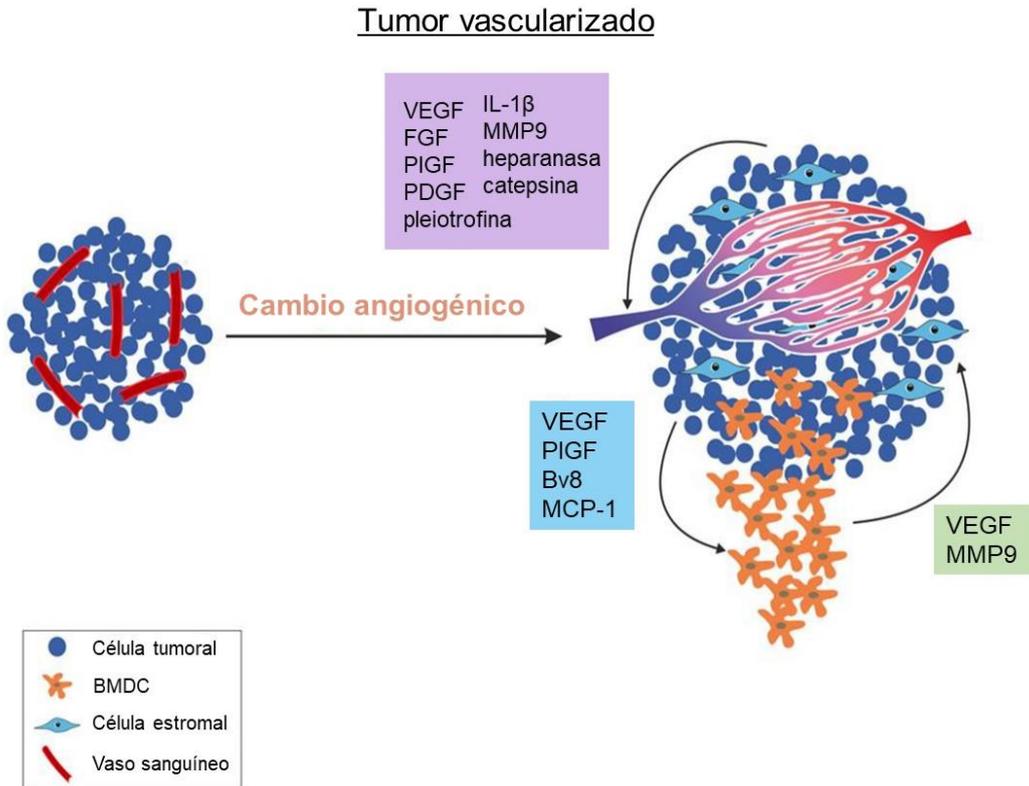


Figura 2.5. Cambio angiogénico que muestra la progresión de hiperplasia a tumor hipervasascularizado. Se representan los factores proangiogénicos y proteasas secretados por las propias células tumorales (recuadro violeta) y las células del sistema inmunitario reclutadas en el sitio del tumor (recuadro verde), y los factores secretados por las células tumorales para reclutar células inflamatorias (recuadro azul). BMDC: células dendríticas derivadas de la médula ósea. Imagen traducida de Saman et al., 2020.

2.1.3.6. Invasión y metástasis

La principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer es la capacidad de las células cancerosas para escapar del tumor primario e invadir otros tejidos, lo que se conoce como metástasis (Dillekås et al., 2019). Para lograr esa capacidad de invadir y establecer tumores secundarios en otras partes del cuerpo, las células tumorales desarrollan mecanismos adicionales, como la expresión de nuevas proteínas de membrana (como integrinas y cadherinas) y moléculas de adhesión, así como la producción de proteasas que les permiten avanzar a través de las células adyacentes y la matriz extracelular.

Este proceso da lugar a una “cascada de invasión y metástasis” que se puede resumir en cinco pasos clave: invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización (**Figura 2.6**). En un principio, las células tumorales invaden los tejidos circundantes al degradar la membrana basal del epitelio (invasión local). Durante este proceso, pueden

acceder a vasos sanguíneos o linfáticos y atravesar sus paredes (intravasación). Posteriormente, viajan a través del sistema circulatorio o linfático como células tumorales circulantes, ya sea de forma individual o en pequeños grupos, rodeadas de plaquetas. Durante esta etapa, solo las células capaces de resistir el estrés mecánico y el reconocimiento inmunológico logran sobrevivir. En un momento concreto, se adhieren a las células endoteliales y abandonan el flujo sanguíneo o linfático al atravesar nuevamente las paredes de los vasos (extravasación). Una vez en su nueva ubicación, estas células forman pequeños nódulos conocidos como micrometástasis. Por último, si las condiciones del nuevo tejido son favorables, las micrometástasis crecen y se multiplican hasta formar tumores macroscópicos (colonización) (Debnath et al., 2021).

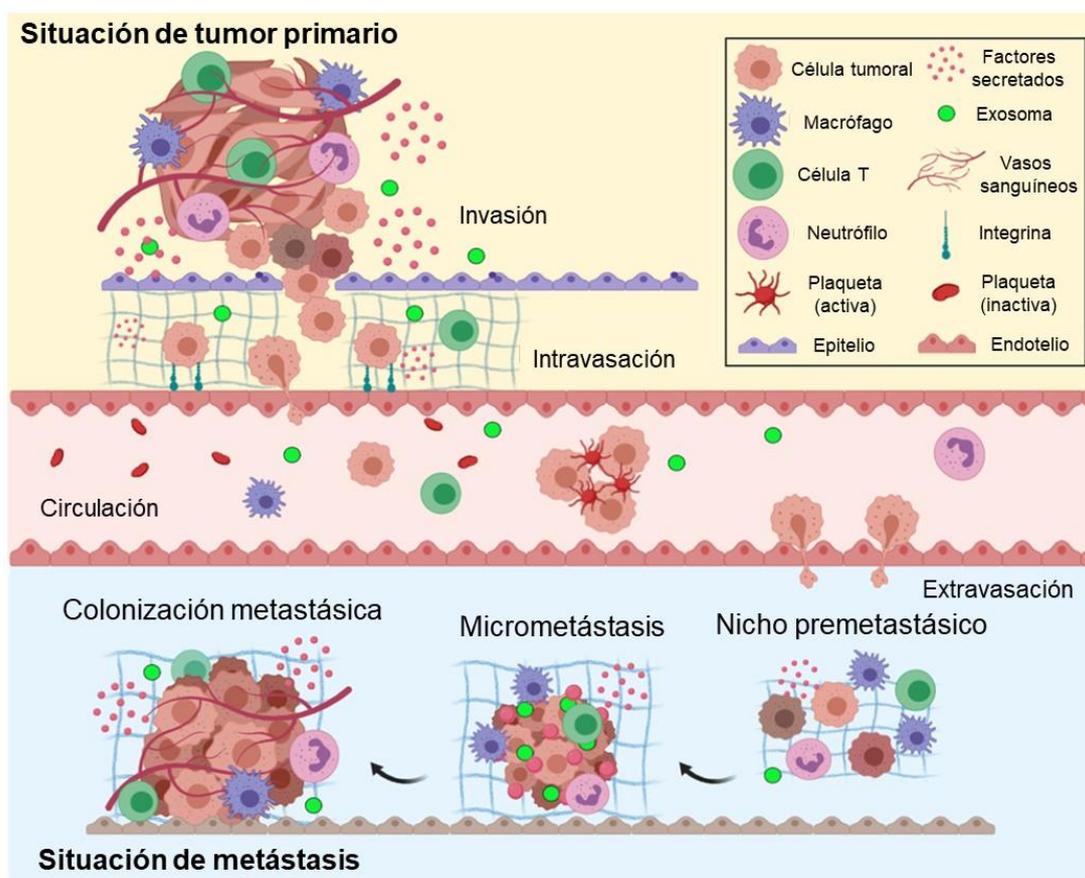


Figura 2.6. Descripción general de la cascada metastásica. Se representan los cinco pasos clave de la metástasis: invasión, intravasación, circulación, extravasación y colonización. Imagen traducida de Fares et al., 2020.

Para explicar este proceso por el cual las células tumorales son capaces de metastatizar se utiliza el concepto de transición epitelio-mesénquima (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*). EMT es un programa morfogénico en el que células con rasgos epiteliales se convierten en células mesenquimales. En este sentido, las células

epiteliales deben perder su polaridad y adhesión a otras células y adquirir la capacidad de migrar e invadir. La transición EMT tiene un papel importante en diferentes procesos del desarrollo embrionario, la reparación de heridas en el tejido adulto, así como en la metástasis del cáncer (Debnath et al., 2021). Durante este programa, se expresan factores de transcripción como Snail1/2, Slug, Twist y Zeb1/2, los cuales confieren a las células la capacidad de movimiento, esencial para dichos procesos. La transición EMT se distingue por la pérdida de las uniones celulares y la adquisición de una morfología mesenquimal o fibroblástica en contraste con la forma poligonal de las células epiteliales (**Figura 2.7**). Estos fenotipos también se caracterizan por la expresión de enzimas que degradan la matriz extracelular, un incremento en la movilidad celular y una mayor resistencia a la muerte celular programada (apoptosis). Todas estas características desempeñan un papel crucial en la invasión y formación de metástasis.

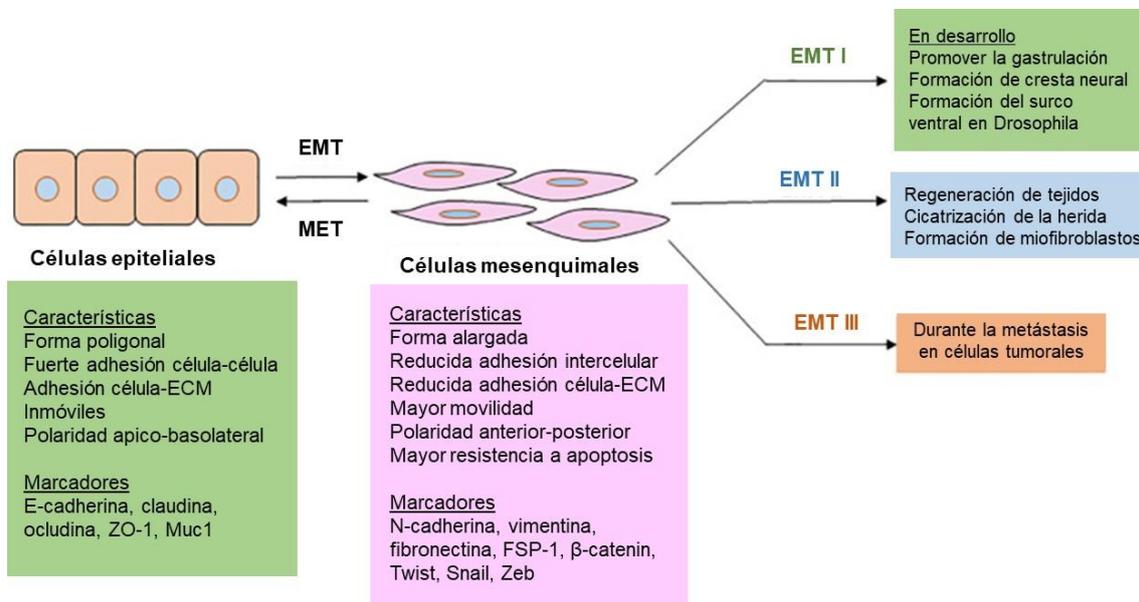


Figura 2.7. Características, marcadores y contexto de la transición epitelio-mesénquima. ECM: matriz extracelular, EMT: transición epitelio-mesénquima, MET: transición mesénquima-epitelio. Imagen adaptada de Debnath et al., 2021.

No obstante, los rasgos característicos del programa EMT no se manifiestan de manera uniforme en un tumor, sino que tienden a expresarse en diferentes grados en distintas zonas del mismo. Se ha identificado la presencia de diversas subpoblaciones tumorales relacionadas con diferentes etapas de la transición EMT: desde estados predominantemente epiteliales hasta estados completamente mesenquimales e invasivos, incluyendo estados híbridos intermedios (Pastushenko et al., 2018). Esta perspectiva concuerda con el papel del microambiente tumoral en la adquisición de la capacidad invasiva (Dongre & Weinberg, 2019).

Las células con capacidad invasiva o metastásica presentan alteraciones en varias clases de proteínas involucradas en la unión de las células a su entorno tisular. Estas proteínas incluyen moléculas de adhesión célula a célula (CAMs, *cell adhesion molecules*), como las cadherinas dependientes del calcio y las inmunoglobulinas, así como las integrinas, que conectan las células con la matriz extracelular. La alteración más comúnmente observada en las interacciones célula-entorno en el cáncer involucra a la E-cadherina, una molécula responsable de las uniones célula-célula en tejidos epiteliales y que contribuye a su morfología laminar al unirse a los dominios extracelulares EC1 de moléculas de E-cadherina de células adyacentes. En la mayoría de los cánceres epiteliales, parece que se pierde la función de esta molécula debido a diversos mecanismos, como la inactivación mutacional de los genes de la E-cadherina, la represión transcripcional o la proteólisis del dominio extracelular de la cadherina (Wong et al., 2018). Por tanto, la pérdida de la expresión de E-cadherina se considera un paso crucial en la adquisición de un fenotipo invasivo. Por el contrario, en las células tumorales que han experimentado la transición EMT, se observa la expresión de moléculas como N-cadherina, que está asociada con la capacidad de migración. Además de las alteraciones en las moléculas de adhesión, las células con capacidad invasiva y metastásica experimentan cambios en las integrinas que presentan en su superficie. En general, estas células reemplazan las integrinas características del tejido epitelial, como las $\alpha 6 \beta 4$ que se unen a la membrana basal, por otras integrinas cuya expresión parece estar asociada a la degradación de la matriz extracelular (Lamouille et al., 2014). La degradación de la matriz extracelular es llevada a cabo por enzimas proteolíticas extracelulares llamadas proteasas (Saitoh, 2018). Estas proteasas pueden ser sintetizadas tanto por las propias células tumorales como por células del microambiente, como los macrófagos asociados al tumor (Kawata et al., 2012). Además, estas células del sistema inmunitario pueden ser reclutadas a través de la liberación de citoquinas. Por lo tanto, se ha visto que la capacidad de invasión y metástasis es un proceso que requiere de la participación de otros componentes del microambiente tumoral.

En definitiva, las células tumorales experimentan cambios en las moléculas de adhesión, integrinas y expresión de proteasas que les permiten invadir tejidos cercanos. Sin embargo, establecerse en tejidos distantes y formar metástasis macroscópicas representa un desafío para estas células, ya que deben adaptarse a los nuevos microambientes. El proceso contrario al programa EMT se conoce como transición mesénquima-epitelio (MET, *mesenchymal-epithelial transition*), donde las células adquieren fenotipos más epiteliales (**Figura 2.7**). Esto explica por qué los tumores

aparentemente erradicados pueden reaparecer meses o años más tarde en sitios metastásicos, cuando las micrometástasis residuales se han adaptado al nuevo entorno y han recuperado su capacidad proliferativa (Chaffer et al., 2007).

La continua investigación y el desarrollo de nuevas técnicas han permitido un mayor conocimiento de las características bioquímicas y moleculares asociadas a los procesos cancerígenos. Además de las seis marcas descritas previamente, es necesario considerar la interacción de las células tumorales con su entorno (microambiente tumoral) y con otras células, incluyendo las del sistema inmune. De esta forma, en 2011, Hanahan y Weinberg ampliaron el catálogo de marcas distintivas del cáncer al agregar dos características adicionales (Hanahan & Weinberg, 2011):

2.1.3.7. Desregulación del metabolismo energético

Las células tumorales a menudo se desarrollan en entornos con escasez de nutrientes y oxígeno, ya que la vascularización de los tumores no es siempre uniforme ni adecuada. Una característica común de estas células es su capacidad para ajustar el metabolismo de manera que puedan aprovechar al máximo los nutrientes disponibles y mantener su viabilidad, permitiéndoles generar la biomasa necesaria para mantener una alta tasa de proliferación (Pavlova & Thompson, 2016). Entre los mecanismos de desregulación del metabolismo energético en las células tumorales, destaca la absorción desmedida de glucosa (Yoshida, 2015).

El aumento en el consumo de glucosa ha sido observado en diversos tipos tumorales y es fundamental para la visualización de tumores mediante la técnica de tomografía por emisión de positrones (PET, *positron emission tomography*). En esta técnica, se monitoriza el consumo de glucosa en los tejidos utilizando ^{18}F -FDG (^{18}F -fluorodesoxiglucosa), un análogo de la glucosa marcado con flúor radiactivo (Almuhaideb et al., 2011).

En condiciones aeróbicas, las células normales utilizan glucosa como fuente de energía, convirtiéndola en piruvato, que luego se metaboliza en las mitocondrias para generar ATP mediante la fosforilación oxidativa. Sin embargo, las células tumorales son capaces de reprogramar su metabolismo energético de la glucosa incluso en presencia de oxígeno, utilizando predominantemente la vía de la glicólisis anaeróbica para producir lactato (Warburg, 1956). A este proceso se le conoce como "glicólisis aeróbica" y al fenómeno en su conjunto se le denomina "efecto Warburg" (**Figura 2.8**).

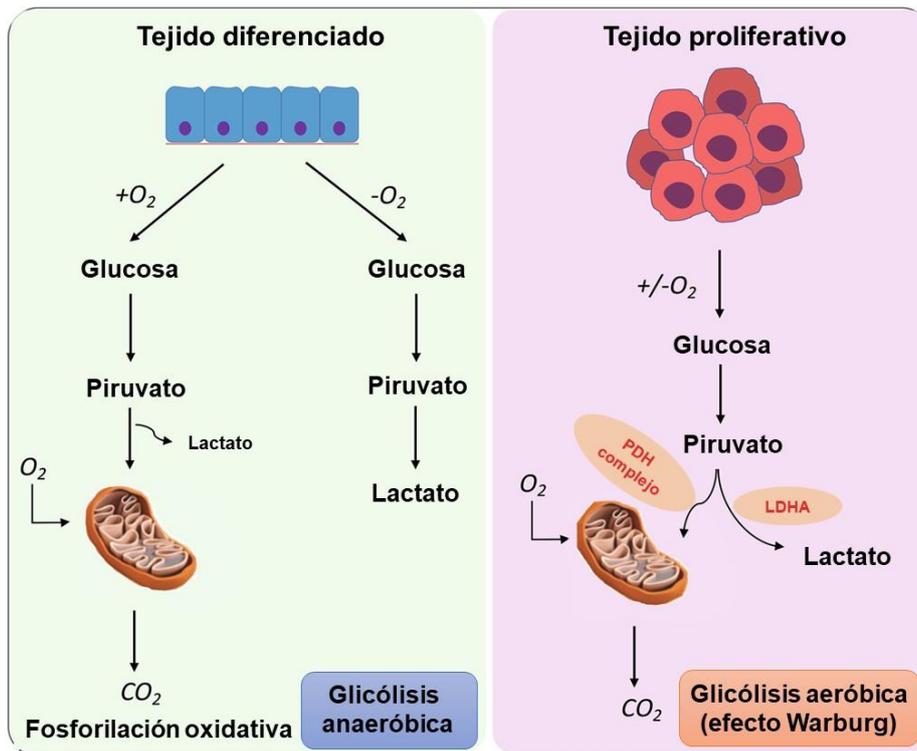


Figura 2.8. Efecto Warburg. Respiración celular en tejido diferenciado normal (izquierda) en comparación con el efecto Warburg en tejido proliferativo (derecha). LDHA: lactato deshidrogenasa, PDH complejo: complejo piruvato deshidrogenasa. Imagen traducida de Bose et al., 2021.

Desde un punto de vista fisiológico, el consumo de nutrientes por parte de las células no es constante, sino que está regulado por señales internas y del microambiente. Los tumores sólidos a menudo presentan áreas con niveles bajos de oxígeno debido a su rápida proliferación celular y la formación anómala de vasos sanguíneos. La presencia de hipoxia (niveles reducidos de oxígeno) en el interior del tumor se relaciona con un mayor riesgo de invasión, diseminación a otros órganos y mayor mortalidad en los pacientes. Las células cancerosas se adaptan a estas condiciones de hipoxia para sobrevivir, y para ello, el factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1, *hypoxia-inducible factor 1*) juega un papel clave. HIF-1 activa la expresión de genes que codifican proteínas responsables de las respuestas adaptativas a hipoxia. Por ejemplo, HIF-1 induce la producción de factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que regula la formación de nuevos vasos sanguíneos, así como transportadores de glucosa (como GLUT1) y enzimas glicolíticas (como hexoquinasa), necesarios para el aumento en la captación y el metabolismo de la glucosa (Masoud & Li, 2015; Semenza, 2009; Tarrado-Castellarnau et al., 2016). Esto resalta la importancia de la reprogramación metabólica en el cáncer para mantener la interacción entre las vías de detección de oxígeno y detección de nutrientes.

En este sentido, la regulación por parte de HIF-1 de múltiples productos genéticos involucrados en el metabolismo y la vascularización de los tumores sugiere que la inhibición de HIF-1 podría tener un mayor efecto anticancerígeno, en comparación con la inhibición de VEGF. HIF-1 es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades, HIF-1 α y HIF-1 β , que pertenecen a la familia de factores de transcripción básicos con un dominio PAS (PER-ARNt-SIM) en su estructura (Wang et al., 1995). Mientras que HIF-1 β se encuentra en las células de manera constante, HIF-1 α se produce en mayores cantidades en respuesta a hipoxia. En condiciones normales de oxígeno, HIF-1 α es sometido a un proceso de hidroxilación que provoca su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma. Sin embargo, en condiciones hipóxicas, la hidroxilación disminuye, HIF-1 α se acumula y dimeriza con HIF-1 β para formar un factor de transcripción capaz de unirse al ADN en los elementos de respuesta a hipoxia (HRE, *hipoxia-response element*) y la activación de la transcripción (Balamurugan, 2016). Además de HIF-1 α , existe otra proteína llamada HIF-2 α , regulada también en función de la cantidad de oxígeno disponible, que dimeriza con HIF-1 β y se une a los HREs.

Durante mucho tiempo, el papel de la glicólisis aeróbica en la tumorigénesis ha sido objeto de debate, ya que implica el uso de un modelo energético de baja eficiencia en células que tienden a dividirse rápidamente, lo cual puede parecer contradictorio. La hipótesis mayormente aceptada en la actualidad sostiene que, aunque la eficiencia en la producción de ATP a través de la glicólisis aeróbica es 18 veces menor que mediante la fosforilación oxidativa (**Figura 2.9**), las células tumorales obtienen otras ventajas al utilizar este mecanismo, como la disponibilidad de intermediarios glicolíticos para la síntesis de nucleósidos y aminoácidos, así como una mejor respuesta a condiciones de hipoxia (Liberti & Locasale, 2016).

Esta reprogramación metabólica que experimentan las células tumorales también tiene consecuencias en el genoma. Las diversas vías metabólicas transmiten información sobre el estado metabólico de la célula a varias enzimas reguladoras, incluyendo aquellas responsables de depositar y eliminar las marcas epigenéticas en el ADN y las histonas (proteínas que permiten la organización del material genético). Entre las principales alteraciones en la regulación génica mediada por el metabolismo destacan las reacciones controladas por enzimas quinasas metiltransferasas y acetiltransferasas (Katada et al., 2012).

Otra de las consecuencias derivada del elevado consumo de glucosa por parte de las células tumorales es la acidificación del medio extracelular (**Figura 2.9**). La enzima

lactato deshidrogenasa convierte el piruvato en ácido láctico, que puede ser exportado fuera de la célula mediante el transportador MCT1 (*monocarboxylate transport 1*). Esta liberación de lactato al espacio extracelular mediante MCT1 se asocia con el transporte simultáneo de H^+ , lo que resulta en la acidificación del entorno celular (Vander Heiden et al., 2009). Alternativamente, el ácido láctico puede ser neutralizado dentro del citosol a través de los iones de bicarbonato (HCO_3^-). La neutralización del ácido láctico en el citosol mediante iones HCO_3^- genera dióxido de carbono (CO_2), que se difunde a través de la membrana celular y se convierte nuevamente en HCO_3^- y H^+ gracias a las anhidrasas carbónicas (Pavlova & Thompson, 2016; Swietach et al., 2007), lo que contribuye a la acidificación del entorno externo. Durante la hipoxia, se incrementa la expresión de estas anhidrasas, especialmente la isoforma CAIX (*carbonic anhydrase IX*) (Svastová et al., 2004). El CO_2 producido por la vía de las pentosas fosfato y/o por las reacciones de descarboxilación mitocondrial también puede contribuir a la acidificación del entorno mediante el mismo mecanismo. No obstante, los iones de HCO_3^- pueden ser posteriormente reabsorbidos por la célula a través de cotransportadores de Na^+/HCO_3^- .

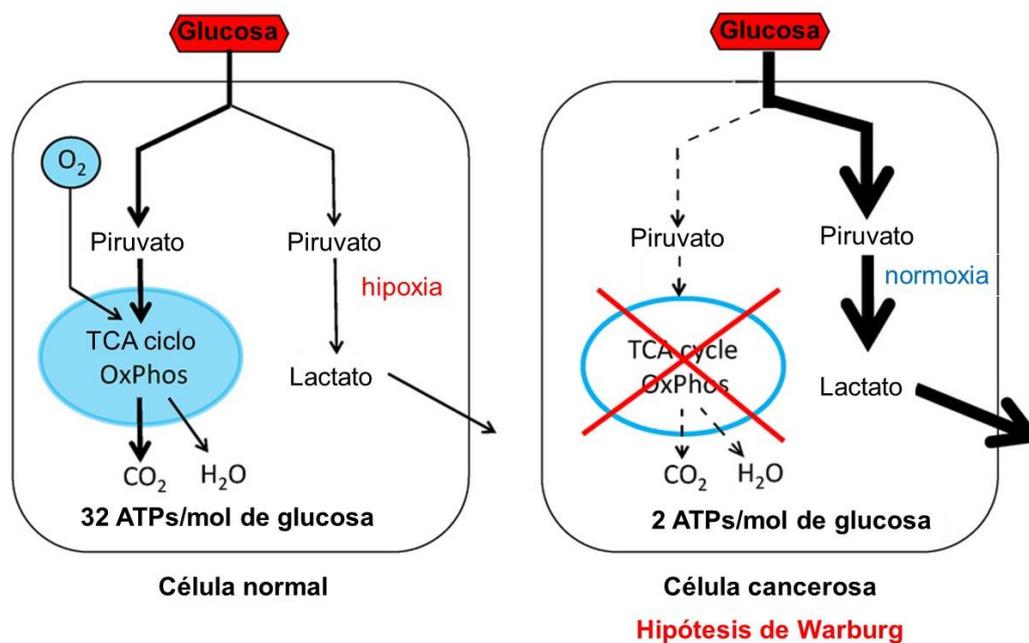


Figura 2.9. Diferencias en el consumo de glucosa entre células normales y cancerosas. OxPhos: fosforilación oxidativa. TCA ciclo: ciclo del ácido tricarbóxico. Imagen traducida de Vaupel & Multhoff, 2021.

La acidificación del entorno extracelular contribuye a la progresión y la invasión tumoral de diversas formas. En primer lugar, la acidificación estimula la actividad proteolítica de las metaloproteinasas de la matriz y las catepsinas, lo que promueve la

degradación de los componentes de la matriz extracelular (ECM, *extracellular matrix*) y facilita la invasión tumoral (Rothberg et al., 2013). También se ha visto que, en general, altos niveles de lactato promueven una respuesta inmune permisiva o tolerante hacia el tumor al disminuir la activación de las células dendríticas y los linfocitos T, así como la migración de monocitos (Damgaci et al., 2018; Huber et al., 2017).

Asimismo, la acidificación modifica el fenotipo de diferentes poblaciones celulares del microambiente tumoral. La acumulación de lactato desempeña un papel importante en la angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos. El lactato promueve la estabilización de HIF-1 α y activa la señalización a través de las vías NF- κ B y PI3K en las células endoteliales. Además, induce la secreción de VEGF por parte de las células del estroma (Boedtkjer & Pedersen, 2020).

2.1.3.8. Evitar la destrucción por el sistema inmune

Las células del sistema inmune desempeñan un papel crucial en la detección y eliminación de células que muestran características malignas en su fenotipo (Lakshmi Narendra et al., 2013). Aunque se han dedicado enormes esfuerzos a la caracterización de las células T, también se ha demostrado que otras células inmunitarias de los sistemas innato y adaptativo, incluidas las células dendríticas, los macrófagos, las células asesinas naturales (NK, *natural killer*) y las células B, contribuyen a la progresión tumoral y la respuesta a la inmunoterapia (Zhang & Zhang, 2020). Asimismo, se ha observado que los tumores con una mayor infiltración de células inmunes tienen un mejor pronóstico en comparación con aquellos con una actividad inmune limitada. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado diferentes estrategias para modificar o evadir la respuesta inmunológica que se dirige contra ellas. Entre las principales estrategias que utiliza el tumor para escapar del sistema inmune destacan el reconocimiento inmunológico reducido, una mayor resistencia o supervivencia de las células cancerosas y el desarrollo de un entorno tumoral inmunosupresor (Muenst et al., 2016).

En el contexto de la disminución del reconocimiento inmunológico, existen dos mecanismos principales de escape tumoral. Por un lado, se encuentra la insuficiente presencia de antígenos tumorales, lo cual afecta principalmente al reconocimiento por parte de las células dendríticas. Por otro lado, está la pérdida del complejo mayor de histocompatibilidad, así como factores similares a este complejo y coestimuladores, lo cual afecta tanto a los linfocitos T como a las células NK (Dhatchinamoorthy et al., 2021).

En términos de mayor resistencia o supervivencia, los principales mecanismos de evasión del sistema inmunitario incluyen el aumento de la expresión de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*), que modula la actividad de las células NK (Kida et al., 2013), y el aumento de la expresión de Bcl-2, que desempeña un papel esencial en el funcionamiento de los linfocitos B y T (Renault & Chipuk, 2013).

En el caso del microambiente tumoral, las células cancerosas pueden modular la expresión de los puntos de control inmunitario o *immune checkpoints*, donde destacan PD-1 (*programmed cell death 1*) y CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) (Topalian et al., 2015), así como provocar la liberación de citoquinas supresoras (como IL-10 y TGF- β), lo que reduce aún más la capacidad para generar una respuesta inmune (Tauriello et al., 2022). Además, este microambiente tumoral permite que los macrófagos asociados a tumores (TAM, *tumor-associated macrophages*) expresen enzimas metabólicas como iNOS o arginasa 1 (ambas enzimas conducen al agotamiento de la arginina) e IDO (una enzima que conduce al agotamiento del triptófano) que inhiben la activación y proliferación de células T (Oh et al., 2020).

El uso de anticuerpos terapéuticos para bloquear la unión de PD-1 y CTLA-4 (**Figura 2.10**) a sus ligandos ha demostrado inducir una respuesta inmune antitumoral en diferentes tipos de cáncer (Jiang et al., 2019; Ribas & Wolchok, 2018; X. Wang et al., 2016; Zou et al., 2016). PD-1 es un receptor expresado en la superficie de las células T que al unirse al ligando PD-L1 (*programmed death-ligand 1*), bloquea la actividad de las células T. La expresión de PD-L1 puede ser inducida en diversos tipos celulares, incluyendo células tumorales y células del sistema inmunitario tras su exposición a citoquinas específicas como el interferón gamma (IFN γ , *interferon-gamma*). El otro ligando de PD-1, PD-L2 (*programmed death-ligand 2*), también inhibe la activación de las células T, pero su actividad es más restringida, ya que lo expresan principalmente las células dendríticas y algunas líneas tumorales (Latchman et al., 2001).

Por otro lado, CTLA-4 ejerce su función por competición con CD28. CTLA-4 y CD28 son dos receptores presentes en la superficie de los linfocitos T. CTLA-4 actúa como un regulador negativo de la activación de los linfocitos T, mientras que CD28 actúa como un regulador positivo. Estos receptores compiten por unirse a los ligandos CD80 (también conocido como B7.1) y CD86 (también conocido como B7.2) situados en las células presentadoras de antígenos. Cuando CTLA-4 se une a estos ligandos, se produce la inactivación de los linfocitos T, lo que impide su capacidad de atacar a las células tumorales.

Estos avances sugieren que la inmunosupresión juega un papel activo en la inhibición de la respuesta inmunitaria antitumoral (Chen & Mellman, 2013). A diferencia de la quimioterapia o las terapias dirigidas, la inmunoterapia busca promover una respuesta antitumoral dinámica que no se limita a una única característica de las células cancerosas, sino que se dirige a múltiples anomalías al mismo tiempo, permitiendo al sistema inmunitario distinguir entre células normales y tumorales.

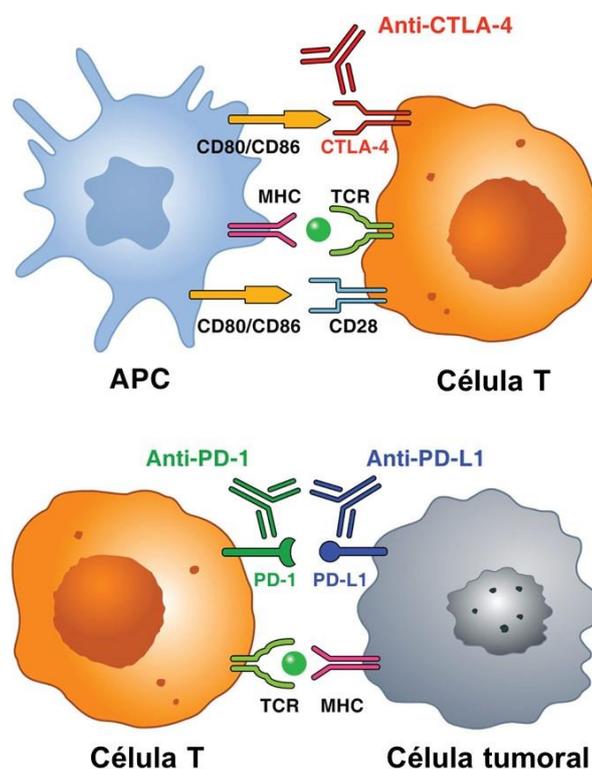


Figura 2.10. Representación esquemática de los principales puntos de control inmunitarios y de sus inhibidores. Imagen traducida de Poto et al., 2022.

Las investigaciones más recientes en el campo de la oncología han identificado dos nuevas capacidades que, después de años de estudio, también pueden ser consideradas características distintivas de las células tumorales, y que promueven el desarrollo del proceso tumoral. Así pues, en 2022, se incluyeron la desregulación de la plasticidad fenotípica y la senescencia celular (Hanahan, 2022).

2.1.3.9. Desbloqueo de la plasticidad fenotípica

Durante el desarrollo de los tejidos y la formación de órganos, las células progenitoras experimentan un proceso de diferenciación terminal en el cual dejan de crecer y adquieren funciones especializadas para mantener la homeostasis. Esta diferenciación

terminal generalmente resulta en la parada de la proliferación celular, lo cual representa una barrera importante para el desarrollo de neoplasias. Sin embargo, cada vez existen más evidencias que sugieren que desbloquear la capacidad de plasticidad fenotípica, que normalmente está restringida, para evadir o escapar del estado de diferenciación terminal, es un componente crítico en la patogénesis del cáncer (Yuan et al., 2019). Esta plasticidad fenotípica se puede manifestar mediante la desdiferenciación de los estados maduros a los progenitores, una diferenciación bloqueada (terminal) de los estados de las células progenitoras y la transdiferenciación en diferentes linajes celulares (**Figura 2.11**).

Las células tumorales nacientes que se originan a partir de una célula normal diferenciada tienen la capacidad de activar mecanismos que les permiten retroceder a un estado de diferenciación anterior, similar al de las células progenitoras (desdiferenciación). Por ejemplo, se ha demostrado que los genes *MITF*, *BRAF* y *ATF2* están involucrados en la aparición de formas agresivas de melanoma maligno mediante procesos de desdiferenciación celular (Köhler et al., 2017; Shah et al., 2010). Asimismo, se ha observado en un estudio reciente que la desdiferenciación del linaje está asociada con la progresión maligna de neoplasias de células de los islotes pancreáticos a carcinomas con alta propensión a metástasis (Saghafinia et al., 2021). Estas células neuroendocrinas y los tumores derivados se originan de un linaje de desarrollo distinto al que genera un gran número de células adyacentes que forman el páncreas exocrino, así como los adenocarcinomas ductales que se originan a partir de este linaje.

Aunque los casos mencionados previamente ejemplifican cómo la reducción en la expresión de factores de diferenciación puede favorecer la formación de tumores al permitir que células altamente diferenciadas retrocedan y se conviertan en progenitoras, en otros casos, una vez que las células alcanzan este estado de célula progenitora, pueden detener el proceso de diferenciación temporalmente, lo que permite la expansión del cáncer mediante divisiones que generan más células con estado progenitor (bloqueo de la diferenciación). Un ejemplo en el caso del melanoma involucra a un factor de transcripción del desarrollo llamado *SOX10*, que normalmente disminuye su expresión durante la diferenciación de los melanocitos. Estudios utilizando un modelo de pez cebra de melanoma inducido por *BRAF* han demostrado que la expresión anormalmente sostenida de *SOX10* bloquea la diferenciación de las células progenitoras neurales en melanocitos, lo que facilita la formación de melanomas impulsados por *BRAF* (Kaufman et al., 2016).

Además, también puede ocurrir la transdiferenciación, donde las células tumorales pueden modificar la ruta de diferenciación previamente establecida y adquirir un nuevo programa de desarrollo, dando lugar a un tipo celular diferente que no se encuentra presente en el tejido de origen. Durante el desarrollo del adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*), las células acinares pancreáticas pueden experimentar transdiferenciación hacia un fenotipo de célula ductal, lo que acelera el desarrollo de PDAC invasivo (Krah et al., 2015).

Estos diferentes ejemplos respaldan la idea de que la plasticidad celular es una característica común en varios contextos tumorales, que desempeña un papel crucial en el mantenimiento de la actividad tumoral y la resistencia a las terapias.

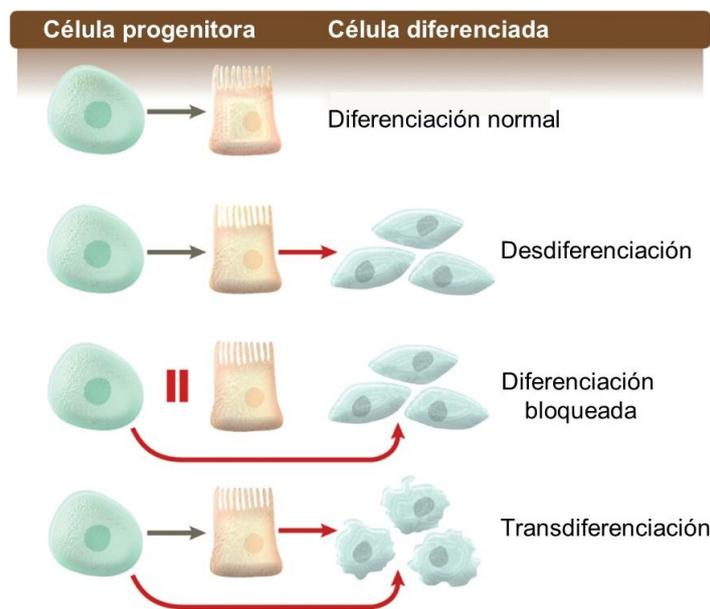


Figura 2.11. Representación de diversos tipos de diferenciación celular en la patogénesis del cáncer. Imagen traducida de Hanahan, 2022.

2.1.3.10. Senescencia celular

La senescencia celular se refiere al estado en el que las células han perdido su capacidad para dividirse y proliferar, utilizado como un mecanismo para mantener la homeostasis. Durante la senescencia, se inhibe el ciclo celular y se producen cambios morfológicos y metabólicos que dan lugar a la activación de un fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*), que implica la liberación de citoquinas, quimioquinas y proteasas. Este proceso generalmente se desencadena en respuesta a condiciones de estrés microambiental, falta de nutrientes, daño en el ADN u orgánulos celulares, o alteraciones en las vías de señalización (Birch & Gil, 2020; Gorgoulis et al., 2019).

La senescencia celular ha sido reconocida durante mucho tiempo como un mecanismo protector contra el desarrollo de neoplasias, en el cual se induce a las células cancerosas a entrar en un estado de senescencia (Lee & Schmitt, 2019). La mayoría de los factores que desencadenan este programa de senescencia están asociados con la malignidad, especialmente el daño al ADN debido a una proliferación descontrolada, conocida como senescencia inducida por oncogenes, y la senescencia inducida por terapias, causada por el daño celular y genómico resultante de la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, investigaciones recientes han relacionado la aparición de la senescencia con un mayor desarrollo tumoral en ciertos contextos. Esto se debe principalmente al efecto del fenotipo SASP adquirido por las células senescentes presentes en el microentorno tumoral, lo que favorece procesos como la proliferación, angiogénesis, invasión e inhibición de la apoptosis. Además, las células tumorales pueden revertir este fenotipo senescente, adquiriendo nuevas características proliferativas que les confieren resistencia a las terapias, o incluso las propias células del microambiente tumoral, como los fibroblastos asociados al cáncer (CAF, *cancer associated fibroblast*) o las células inmunes, pueden adoptar este fenotipo (Faget et al., 2019).

Para explicar cómo las células adquieren estas capacidades necesarias para desarrollar y progresar en el proceso oncogénico, se han propuesto una serie de "características habilitadoras" que explican los mecanismos mediante los cuales las células adquieren las denominadas "características o marcas distintivas del cáncer". Estas características habilitadoras se han actualizado a medida que se ha aumentado el conocimiento sobre el proceso tumoral. En un estudio inicial, se consideró que la inestabilidad genómica era el factor principal, ya que provocaba alteraciones aleatorias en el genoma, incluyendo la reorganización cromosómica (Hanahan & Weinberg, 2000). Posteriormente, se han incorporado otras características, como el estado inflamatorio de las lesiones pre-malignas y malignas, que está determinado en gran medida por las células del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011), así como la reprogramación epigenética no mutacional y los polimorfismos microbianos (Hanahan, 2022).

2.1.3.11. Inestabilidad genética y mutaciones

La adquisición de las distintas marcas mencionadas previamente depende en gran parte de una serie de modificaciones en los genomas de las células tumorales. Algunos genotipos mutantes proporcionan una ventaja selectiva a las subpoblaciones de células, lo que les permite crecer y dominar en un entorno tisular específico. Como resultado, el avance del tumor puede entenderse como una serie de etapas desencadenadas por la

adquisición fortuita de genotipos mutantes beneficiosos en las que se expanden clones celulares sucesivamente.

Los sistemas de mantenimiento del genoma tienen la capacidad de detectar y corregir defectos en el ADN, lo que generalmente resulta en tasas bajas de mutación espontánea en cada generación celular. Sin embargo, durante la adquisición de las mutaciones necesarias para impulsar la tumorigénesis, las células cancerosas suelen aumentar su tasa de mutación. Esto puede ser resultado de una mayor sensibilidad a agentes mutagénicos, fallos en los componentes de la maquinaria de mantenimiento del genoma, o una combinación de ambos factores. Además, la acumulación de mutaciones puede ser acelerada al comprometer los sistemas de vigilancia que normalmente controlan la integridad genómica y llevan a las células dañadas genéticamente a la senescencia o apoptosis. En este sentido, el gen *TP53* desempeña un papel fundamental y se le conoce como el "guardián del genoma" (Jackson & Bartek, 2009; Sigal & Rotter, 2000).

Se ha observado una amplia variedad de defectos que afectan a diferentes componentes de la maquinaria de mantenimiento del ADN, incluyendo genes involucrados en la identificación de daños en el ADN, activación de la maquinaria de reparación del ADN dañado e inactivación de agentes mutagénicos (Carusillo & Mussolino, 2020; Negrini et al., 2010). Otra fuente de inestabilidad genómica en los tumores es la pérdida del ADN telomérico, lo que puede resultar en inestabilidad cariotípica y la amplificación o deleción de segmentos cromosómicos (Lansdorp, 2022). La telomerasa, en este contexto, va más allá de ser una característica habilitadora del potencial replicativo ilimitado y se añade a la lista de proteínas responsables del mantenimiento de la integridad del genoma.

2.1.3.12. Inflamación mediada por el tumor

Desde hace tiempo, se ha observado que prácticamente todas las regiones tumorales muestran infiltración de células del sistema inmune. Inicialmente, se creía que esta reacción inflamatoria era principalmente un esfuerzo del sistema inmunitario para erradicar los tumores y, de hecho, cada vez hay más pruebas de la existencia de una respuesta inmune contra los tumores en diversos tipos de cáncer, lo que ejerce presión sobre el tumor para evadir su destrucción por medio del sistema inmune (Dvorak, 2019). Sin embargo, investigaciones posteriores han revelado que esta respuesta inflamatoria asociada al tumor promueve la adquisición de varias características distintivas de las células tumorales mediante la liberación de moléculas bioactivas en el microambiente tumoral, como factores de crecimiento que favorecen la señalización proliferativa,

factores de supervivencia que evitan la muerte celular, factores que facilitan la angiogénesis, invasión y metástasis, y señales que inducen la activación de la transición epitelio-mesénquima y otros programas que favorecen el desarrollo tumoral (DeNardo et al., 2010; Talmadge et al., 2007). La inflamación destaca en las etapas tempranas del desarrollo de tumores y puede promover el avance de lesiones preneoplásicas a cánceres plenamente desarrollados (Kim & Bae, 2016). En definitiva, la inflamación se considera una característica que contribuye a la adquisición de capacidades distintivas por parte de las células tumorales.

2.1.3.13. Reprogramación epigenética no mutacional

Además de la inestabilidad genómica y mutacional como factor clave en la formación y progresión del cáncer, también existen mecanismos epigenéticos de reprogramación, como la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas y proteínas no histonas, que contribuyen al desarrollo y progresión del tumor (Berdasco & Esteller, 2010; Jones & Baylin, 2007). Estos mecanismos epigenéticos son aquellos implicados en los cambios de los patrones de expresión génica que no modifican la secuencia de ADN. Las alteraciones epigenéticas más estudiadas son la metilación del ADN, que consiste en la adición de grupos metilo a ciertas regiones del genoma, y la modificación de las proteínas histonas que rodean al ADN, lo que afecta su accesibilidad para la maquinaria celular que regula la transcripción génica. De igual manera, numerosos estudios incorporan también a la metilación de proteínas no histonas como una alteración epigenética que participa en la regulación de diversos procesos biológicos, incluido el cáncer (Lan & Shi, 2009; Yang & Bedford, 2013).

La metilación del ADN es una modificación epigenética ampliamente estudiada que implica la unión de un grupo metilo al residuo de citosina en el ADN, formando 5-metilcitosina (5mC). La principal ubicación de la metilación del ADN son las islas de citosina-fosfato-guanina (CpG) que se encuentran en los promotores de los genes. Un aumento en la metilación de estas islas CpG puede modificar la estructura de la cromatina y reprimir la expresión de los genes, mientras que la desmetilación del ADN puede activar la expresión génica. Las modificaciones de histonas se producen en las colas N-terminales de estas proteínas, regulando así la estructura y función de la cromatina. En estas modificaciones epigenéticas destacan procesos de acetilación y metilación, aunque también incluyen ubiquitinación, fosforilación y ADP-ribosilación. En general, la acetilación de histonas relaja la estructura de la cromatina y activa la expresión de genes, mientras que la desacetilación de histonas silencia la expresión de genes. En cambio, la metilación de histonas y sus efectos en la transcripción son más

complejos y pueden tanto activar como reprimir genes según el residuo específico que adquiera un grupo metilo (Luo et al., 2021).

Por otro lado, la metilación en determinados aminoácidos de las proteínas no histonas ha surgido recientemente como una modificación predominante que ocurre en numerosas proteínas, extendiendo así su papel mucho más allá del código de histonas (Wu et al., 2017). Se ha descubierto que esta modificación regula la actividad de ciertas proteínas, sus interacciones con otras proteínas y su relación con otras modificaciones postraduccionales, convirtiéndose en un coordinador esencial de diversos procesos biológicos, como la reparación del ADN, crecimiento celular, metabolismo y transducción de señales, entre otros.

Existen cada vez más evidencias que sugieren que esta reprogramación epigenética no mutacional desempeña un papel importante en la obtención de características distintivas durante el desarrollo y la progresión del tumor maligno (Hanahan, 2022). En este sentido, se ha demostrado que el microambiente tumoral puede causar cambios epigenéticos que promueven el crecimiento y la invasividad de las células cancerosas. La hipoxia, la falta de nutrientes o la modificación de la matriz extracelular son ejemplos de factores que contribuyen a la reprogramación epigenética de las células cancerosas (Gameiro & Struhl, 2018; Odenthal et al., 2016; Thienpont et al., 2016). También se ha descubierto que existen cambios epigenéticos no basados en mutaciones que contribuyen a la diversidad fenotípica del tumor y, por tanto, están relacionados con la progresión del tumor. Por ejemplo, la expresión dinámica de la histona H1 y la plasticidad regulada epigenéticamente en los carcinomas de células escamosas orales (Puram et al., 2017; Torres et al., 2016). Otro ejemplo se refleja mediante el hecho de que las células del estroma tumoral, como los fibroblastos asociados al tumor, células del sistema inmune y células endoteliales, son influenciadas por las células tumorales, lo que modifica su actividad y favorece la proliferación e invasión del tumor. Estas modificaciones suelen estar acompañadas de alteraciones epigenéticas en las células del estroma, lo que afecta a la liberación de sustancias reguladoras como citoquinas, quimioquinas o factores de crecimiento, y altera su propia actividad celular (Lu et al., 2020). Además, estudios realizados en nuestro grupo de investigación evidenciaron que el bloqueo de la maquinaria epigenética de las células tumorales permitió no solo su eliminación, sino también mejorar la resistencia de estas células a otras terapias convencionales, como la quimio-, la radio- o la inmunoterapia (Montenegro et al., 2012, 2015, 2020). Si bien es cierto que la mayoría de científicos siempre han considerado a la metilación del ADN o de las proteínas histonas como mecanismos epigenéticos, los hallazgos de nuestro grupo respaldan la idea de que al dirigirnos a la maquinaria

epigenética, también alteramos los patrones de metilación de otras proteínas no histonas, como SET9 o PRMT1 (Montenegro et al., 2016b, 2020).

2.1.3.14. Polimorfismos microbianos

En el cuerpo humano residen billones de microorganismos (como hongos, bacterias y virus) que interactúan constantemente con el huésped en diferentes sitios, incluida la piel y las superficies mucosas como el tracto gastrointestinal, durante todo el desarrollo. Cada vez más se aprecia que los ecosistemas generados por estos microorganismos (los microbiomas) influyen en la salud y en la enfermedad (Thomas et al., 2017). Este papel del microbioma ha adquirido relevancia con el avance del conocimiento sobre su funcionalidad para el organismo. Investigaciones recientes se centran en explorar cómo las alteraciones en el microbioma pueden influir en los procesos cancerígenos, tanto favoreciéndolos como inhibiéndolos (Dzutsev et al., 2017; Helmink et al., 2019). En particular, se ha estudiado la posible relación entre el microbioma intestinal y el cáncer de colon, buscando asociaciones entre la presencia de ciertos microorganismos y la incidencia de este tipo de cáncer (Sears & Garrett, 2014). Aunque no se comprende completamente el mecanismo detrás del papel de ciertos microorganismos en la formación de tumores, se sugiere que podría estar relacionado con el aumento de la inestabilidad genómica de las células debido a toxinas bacterianas o compuestos que estimulen la proliferación celular. Además, el microbioma puede modular la respuesta inmunitaria mediante la expresión de ciertas citoquinas y metabolitos microbianos, lo que podría afectar al entorno celular y provocar inmunosupresión (Sepich-Poore et al., 2021). También se han identificado relaciones entre ciertas bacterias y tumores sólidos específicos, lo que destaca la influencia del microbioma en el desarrollo y progresión del cáncer (Nejman et al., 2020).

A pesar de que este conjunto de características permite diseñar un esquema con las principales marcas que definen a las células y el proceso tumoral (**Figura 2.12**), así como establecer algunas teorías sobre el origen de este proceso (Jassim et al., 2023), el cáncer continúa siendo uno de los desafíos más grandes para la salud global, ya que sigue afectando a millones de personas en todo el mundo (Sung et al., 2021). Además de ser un proceso muy complejo, donde influyen factores como cambios mutacionales y no mutacionales, microambiente y sistema inmune, el cáncer es una enfermedad heterogénea con variabilidad tanto entre tumores (heterogeneidad intertumoral) como en los genotipos y fenotipos de las células dentro de un mismo tumor (heterogeneidad intratumoral).

A medida que la investigación avanza, es probable que nuevas características sean incorporadas en el futuro para lograr una caracterización más precisa y fiel de la realidad sobre el origen y progresión del cáncer, siguiendo una evolución constante desde las primeras clasificaciones hasta la actualidad.

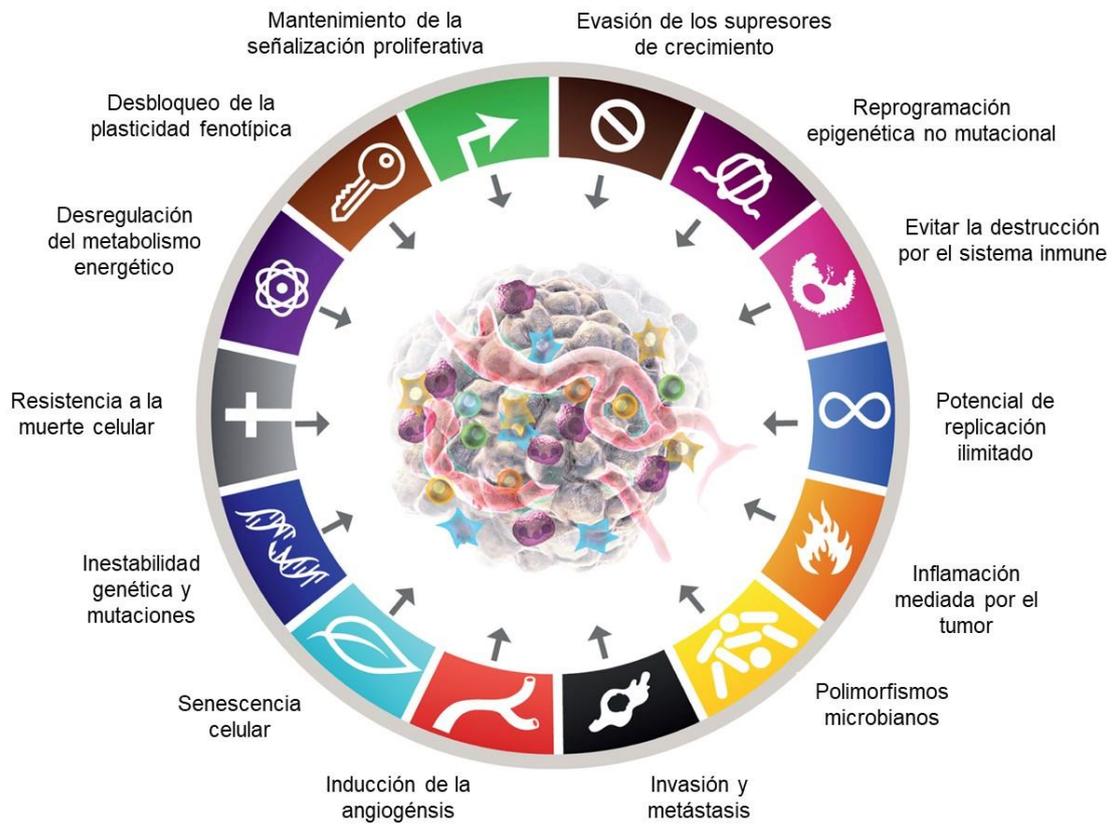


Figura 2.12. Características distintivas del cáncer. Características moleculares, bioquímicas y celulares que las células tumorales adquieren en la mayoría de las situaciones. Imagen traducida de Hanahan, 2022.

2.2. CÁNCER DE PIEL

El cáncer de piel es la forma más prevalente de neoplasia en los seres humanos y su incidencia ha experimentado un incremento global en los últimos años. Históricamente, el cáncer de piel ha sido clasificado en dos categorías principales: el cáncer de piel no melanoma y el melanoma, siendo este último el responsable de la mayoría de las muertes por este tipo de cáncer. Así pues, gran parte de esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio específico del cáncer de piel tipo melanoma.

2.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA

El cáncer de piel no melanoma abarca todos los tipos de cáncer que se desarrollan a partir de las diversas células que forman la piel, excluyendo a los melanocitos. Dentro de esta categoría, destacan el carcinoma basocelular y el carcinoma de células escamosas, ya que en conjunto representan más del 95% de todos los cánceres de piel no melanoma (Didona et al., 2018).

El carcinoma de células basales o basocelular es la forma más frecuente de cáncer de piel representando el 75% de los carcinomas cutáneos. Se origina en las células del estrato basal, que es la capa más interna de la epidermis (**Figura 2.13**). Por lo general, se asocia con una exposición acumulativa de radiación ultravioleta (UV) y se caracteriza por su aparición en la cabeza y el cuello como una protuberancia en la piel que puede tener un aspecto brillante y presentar pequeños vasos sanguíneos o incluso ulceraciones. Es un tipo de carcinoma de crecimiento lento que raramente se disemina a otras áreas del cuerpo ni suele ser mortal para el individuo. Sin embargo, si no es tratado, puede provocar desfiguración, sangrado y destrucción local en áreas como los ojos, nariz, orejas y labios.

El carcinoma de células escamosas o espinocelular se desarrolla a partir de las células del estrato espinoso de la epidermis (**Figura 2.13**), mayoritariamente queratinocitos, y representa aproximadamente el 25% de todos los cánceres de piel no melanoma. Por lo general, suele originarse en las áreas de la piel más expuestas a la radiación ultravioleta; sin embargo, a diferencia del carcinoma basocelular, también puede surgir en otras partes del cuerpo, como los genitales, mucosas, palmas de las manos y plantas de los pies. Inicialmente, se manifiesta como una zona roja con una superficie escamosa y costrosa que no cicatriza. A medida que progresa, el tumor puede volverse nodular y firme, a veces con una superficie verrugosa. Con el tiempo, se convierte en una úlcera abierta y se expande hacia el tejido subyacente. Además,

ocasionalmente, puede extenderse a ganglios linfáticos regionales u otros órganos causando cánceres secundarios.

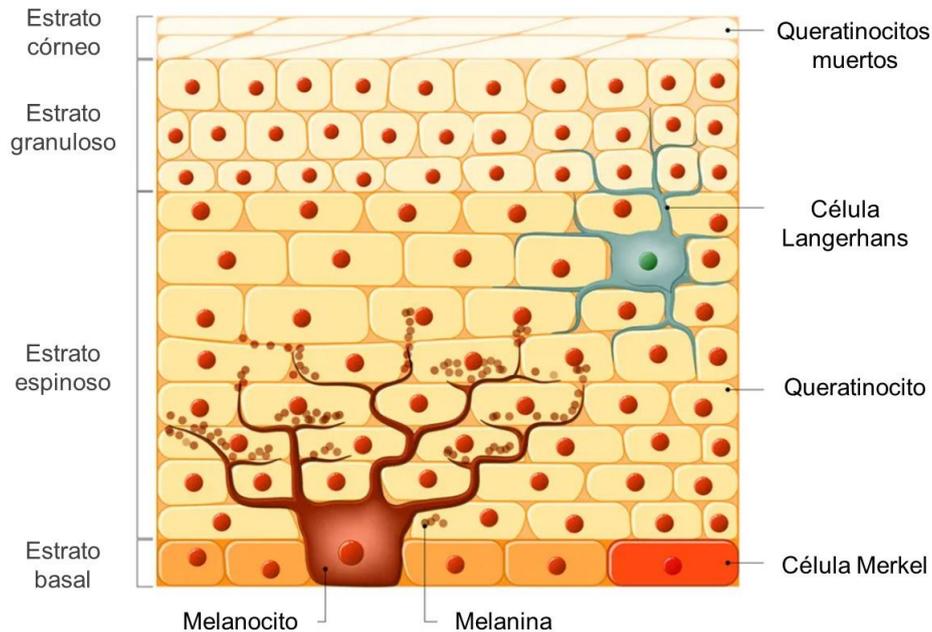


Figura 2.13. Representación gráfica de los estratos y tipos celulares de la epidermis (capa externa de la piel). Imagen traducida de la página web *Vector Stock*.

Además, dentro de esta categoría se engloban otros tipos de cáncer menos comunes, tales como el carcinoma de glándulas sebáceas, el adenocarcinoma de glándulas sudoríparas, el carcinoma de células de Merkel o neuroendocrino, algunos linfomas cutáneos y varios sarcomas como el sarcoma de Kaposi, el angiosarcoma, el dermatofibrosarcoma protuberante y el sarcoma epiteliode.

2.2.2. MELANOMA

Es una neoplasia que se origina en los melanocitos, las células encargadas de proporcionar coloración a la piel, el cabello y los ojos mediante la producción del pigmento melanina. Aunque el melanoma afecta principalmente a la piel en un 90% de los casos, también puede surgir de melanocitos no cutáneos presentes en la coroides del ojo, las leptomeninges y los tractos genitourinario y gastrointestinal. Este tipo de cáncer tiene una alta capacidad de propagación a otros órganos (metástasis) y, a pesar de ser menos común que los cánceres de piel tipo no melanoma, representa el 75% de las muertes por cáncer de piel. Detectar el melanoma en etapas tempranas es especialmente crucial, ya que la tasa de supervivencia disminuye drásticamente a medida que el tumor penetra más profundamente en la dermis.

Existen cuatro subtipos histológicos de melanoma cutáneo: el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el melanoma de lentigo maligno y el melanoma lentiginoso acral (Scatena et al., 2021).

El melanoma de extensión superficial es el tipo más común de melanoma, representando el 70% de los casos, es generalmente asintomático y se localiza principalmente en las piernas y el torso. Se origina normalmente a partir de un lunar existente, el cual crece sin penetrar las capas más profundas de la piel. La lesión suele ser plana e irregular con áreas de diferente pigmentación, de color marrón claro u oscuro.

El melanoma nodular representa aproximadamente del 15 al 30% de los casos de melanoma. Puede aparecer en cualquier parte del cuerpo y se presenta como una pápula o placa protuberante de color oscuro, con tonalidades que varían desde el gris perlado hasta el negro. En algunas ocasiones, las lesiones pueden carecer de pigmento. El melanoma nodular tiende a desarrollarse rápidamente, penetrando en las capas internas de la piel.

El melanoma *in situ* o lentigo maligno supone el 10% de los melanomas y suele aparecer en personas de edades avanzadas como una mancha muy pigmentada, irregular y de larga evolución. Es más frecuente en áreas de la piel más expuestas a la radiación UV, como la cara, el cuello y los brazos. Es el tipo menos agresivo, pudiendo permanecer en su lugar (*in situ*) durante varios años hasta que se observa endurecimiento o ulceración, lo que indica su progresión hacia un melanoma invasivo.

El melanoma lentiginoso acral representa la variante menos frecuente de melanoma, alrededor del 5% de los casos. Es el tipo más común en individuos de piel oscura. Suele manifestarse en las palmas de las manos, las plantas de los pies o debajo de las uñas. Se inicia como una mancha superficial con pigmentación irregular en distintos tonos, y luego se extiende de forma radial antes de volverse infiltrante.

2.2.2.1. Melanocitos y melanoma

El melanoma cutáneo se desarrolla debido al crecimiento descontrolado de los melanocitos epidérmicos. Los melanocitos son células especializadas derivadas de la cresta neural que se localizan principalmente en la piel y los ojos, y son responsables de producir melaninas, los pigmentos que determinan el color de la piel, pelo y ojos (Ostrowski & Fisher, 2021). Concretamente, los melanocitos cutáneos se originan a partir de progenitores de la cresta neural que migran hacia la piel durante el desarrollo embrionario. En la piel, estos melanocitos se encuentran en el estrato basal de la

epidermis (**Figura 2.13**), donde su actividad está regulada por los queratinocitos epidérmicos (J. X. Wang et al., 2016).

En respuesta a la radiación UV, los queratinocitos secretan factores que activan a los melanocitos para producir melanina (**Figura 2.14**). Este proceso se debe al daño en el ADN causado por la luz UV, lo que lleva a la estabilización de la proteína supresora de tumores p53. Esta proteína induce la expresión de la proopiomelanocortina (POMC) para producir la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH, *alpha melanocyte stimulating hormone*), la cual es liberada por los queratinocitos (Cui et al., 2007).

La hormona α -MSH actúa sobre los melanocitos a través de la unión a su receptor, el receptor de melanocortina 1 (MC1R, *melanocortin 1 receptor*). Este receptor es altamente polimórfico y ciertas variantes no activan la señalización intracelular, lo que se asocia con el fenotipo de cabello pelirrojo y piel clara (Mitra et al., 2012). La activación de MC1R aumenta los niveles de AMPc, lo que activa a la proteína quinasa A (PKA, *protein kinase A*) y esta a su vez activa al factor de transcripción CREB (*cAMP-response element binding protein*), el cual induce una mayor expresión del factor de transcripción MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) en los melanocitos. A su vez, MITF estimula la expresión de los genes implicados en la síntesis de melanina y la formación de melanosomas. La melanina producida es almacenada en los melanosomas y transportada hacia los queratinocitos que distribuyen los melanosomas alrededor del núcleo para proteger su ADN de los efectos nocivos de la exposición UV (**Figura 2.14**).

Las dos formas más comunes de melanina son la eumelanina, que presenta un color que va del marrón al negro, y la feomelanina, que tiene un color que va del amarillo al rojo (Ostrowski & Fisher, 2021). La eumelanina tiene la capacidad de absorber la radiación UV dañina y convertirla en calor mediante un proceso químico conocido como conversión interna. Esta característica fotoprotectora permite que la melanina sea capaz de disipar casi toda la radiación UV en forma de calor, protegiendo así el ADN genómico de posibles daños. En cambio, la feomelanina no muestra esta capacidad de absorción de luz UV e incluso puede contribuir a la generación de especies reactivas de oxígeno (Nasti & Timares, 2015).

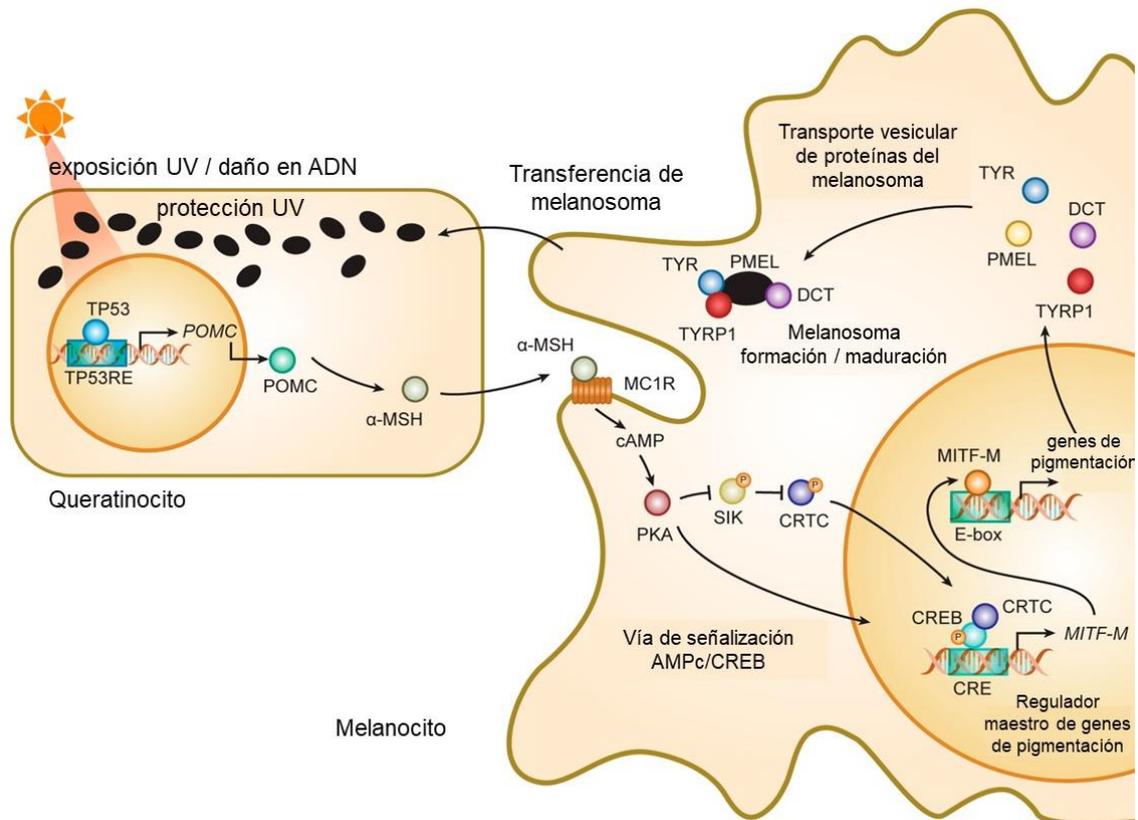


Figura 2.14. Función de MITF en el proceso de producción de melanina en la piel humana. AMPc: adenosín monofosfato cíclico, CRE: elemento de respuesta al AMPc, CREB: proteína de unión a CRE, CRTCC: coactivador transcripcional regulado por CREB, MC1R: receptor de melanocortina 1, MITF: factor de transcripción asociado a microftalmia, α -MSH: hormona estimulante de los melanocitos alfa, PKA: proteína quinasa A, POMC: proopiomelanocortina, SIK: quinasa inducible por sal, TYR: tirosinasa, TYRP1: proteína 1 relacionada con la tirosinasa. Imagen traducida de Hida et al., 2020.

2.2.2.2. Patogénesis del melanoma

Desde finales del siglo XX, se postula que el melanoma sigue un modelo de progresión secuencial (Clark et al., 1984). Según el modelo de Clark, la progresión del melanoma se inicia con una proliferación anómala de melanocitos, debido mayoritariamente a alguna alteración genética provocada por la radiación UV, lo que origina los lunares atípicos. Estos lunares pueden evolucionar hacia una fase de crecimiento radial donde hay una expansión superficial de melanocitos confinada a la epidermis y con bajo potencial invasivo de la dermis. Finalmente, las células ingresan en una fase de crecimiento vertical, adquiriendo la capacidad de invadir la dermis y alcanzar los vasos sanguíneos o linfáticos para metastatizar, principalmente en el hígado, pulmón y cerebro (**Figura 2.15**). Sin embargo, no todos los melanomas se

desarrollan a partir de lunares previos. Otros modelos postulan que los melanomas cutáneos malignos pueden surgir directamente como tumores de crecimiento radial o vertical a partir de un único melanocito transformado (Rastrelli et al., 2014).

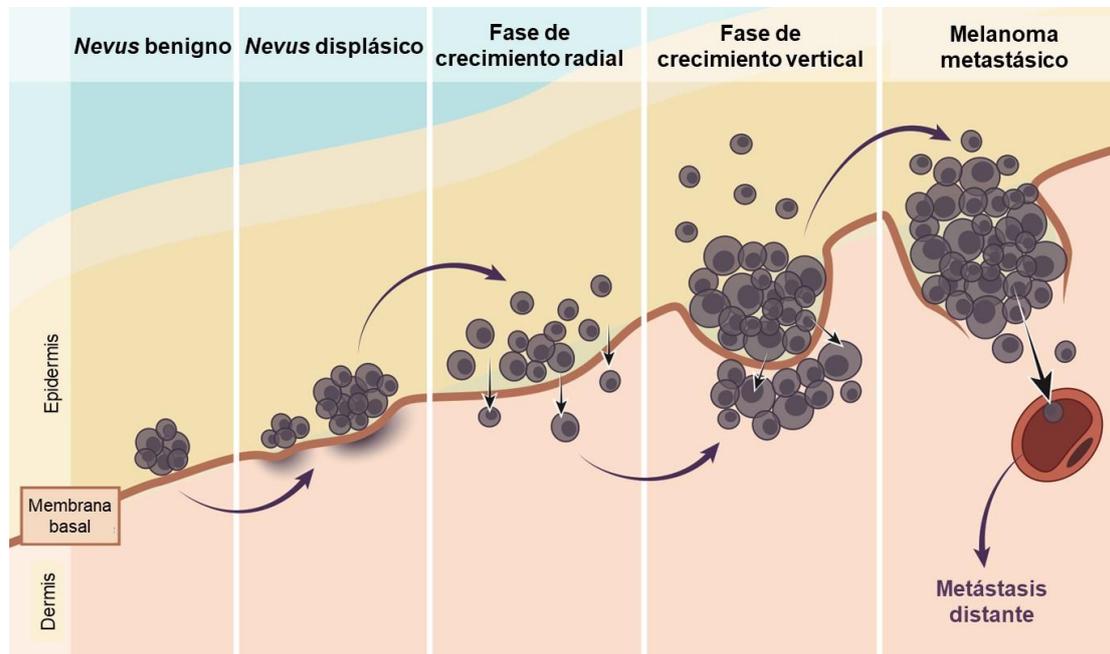


Figura 2.15. Representación gráfica del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma. Imagen adaptada de la página web *McMaster Pathophysiology Review*.

2.2.2.3. Epidemiología

De acuerdo con las más recientes estimaciones proporcionadas por la base de datos GLOBOCAN (*global cancer observatory*), en el año 2020 se diagnosticaron aproximadamente 325000 nuevos casos de melanoma maligno cutáneo, y se documentaron alrededor de 57000 fallecimientos a nivel global debido a esta enfermedad (**Figura 2.16A**). Además, se proyecta un notable incremento de aproximadamente 185000 nuevos casos de melanoma para el año 2040 (**Figura 2.16B**), lo cual resalta la importancia de abordar eficazmente su diagnóstico y tratamiento.

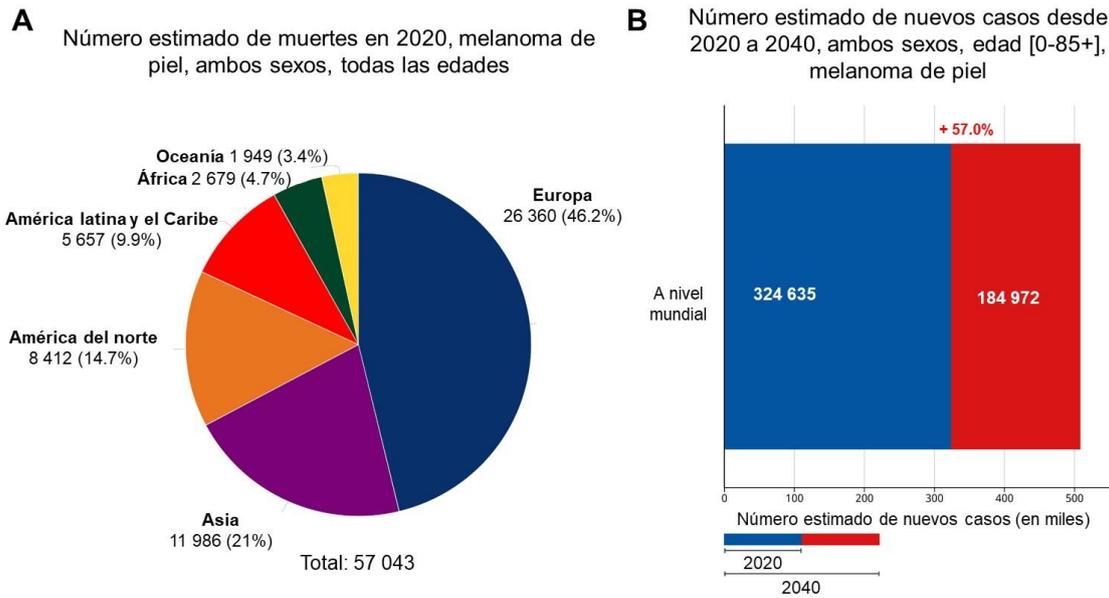


Figura 2.16. Datos estimados tanto de muertes como de nuevos casos de melanoma por cada 100000 habitantes, a nivel mundial. **A)** Número estimado de muertes por melanoma en 2020. **B)** Número estimado de nuevos casos de melanoma desde 2020 hasta 2040. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

La gran mayoría de los casos diagnosticados en 2022, alrededor del 85%, se producen en los continentes más desarrollados, tales como Oceanía, Norte de América y Europa. En estos lugares, el melanoma ocupa el sexto lugar como el cáncer diagnosticado con mayor frecuencia (**Figura 2.17A**). Estas variaciones en la distribución del melanoma han sido relacionadas con modificaciones en los hábitos de exposición a la radiación ultravioleta solar por parte de la población mundial. Asimismo, se ha visto que el riesgo de desarrollar melanoma cutáneo es aproximadamente 10 veces mayor en la población de piel clara que en la población de piel oscura, debido probablemente a la mayor sensibilidad de la piel clara a la exposición solar (Raimondi et al., 2020).

Los países del continente africano y del asiático, donde la población tiene fototipos altos de piel, más adaptados para resistir niveles elevados de radiación ultravioleta, se caracterizan por presentar las tasas de incidencia más bajas de melanoma a nivel mundial (**Figura 2.17B**). Esto también puede deberse en parte a que en estas regiones no hay una cultura de ocio centrada en la exposición solar como ocurre en países con tasas más altas de incidencia. Además, las personas suelen cubrirse con ropas amplias por razones culturales, lo que actúa como una barrera de protección frente a la radiación UV.

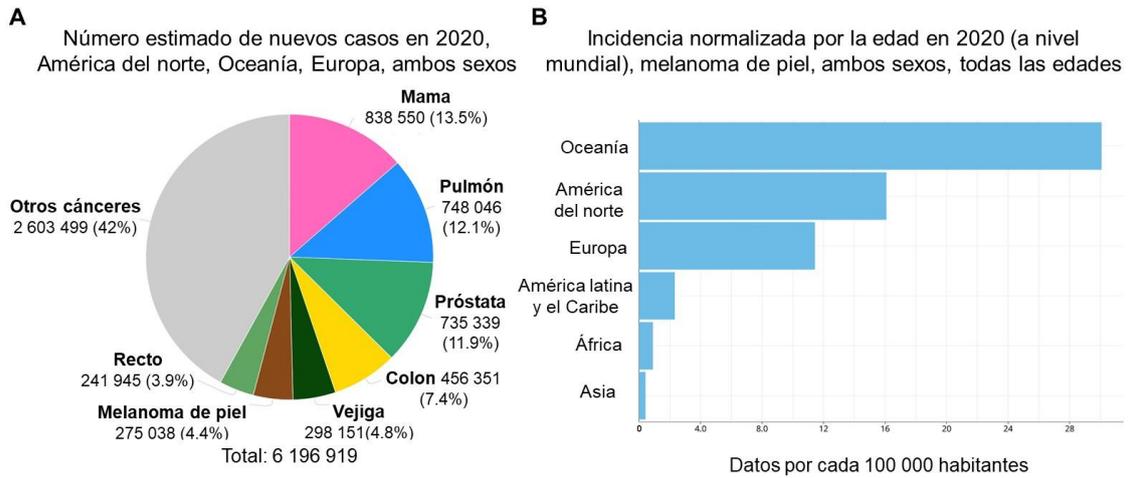


Figura 2.17. Datos estimados tanto de nuevos casos de cáncer en países más desarrollados como de las tasas de incidencia de melanoma en todo el mundo. **A)** Número estimado de nuevos casos de cáncer en 2020 en los países de América del Norte, Oceanía y Europa. **B)** Tasas de incidencia de melanoma de piel por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel mundial. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

En Europa, se han registrado tasas de incidencia intermedias de melanoma, donde los valores más elevados se han observado en los países escandinavos (**Figura 2.18**). Esta situación parece estar relacionada con la costumbre social establecida de los habitantes de estos países nórdicos, quienes tienen fototipos bajos de piel y suelen realizar actividades turísticas en regiones más soleadas del Mediterráneo, donde se llevan a cabo patrones intensos de exposición solar (Garbe & Leiter, 2009).

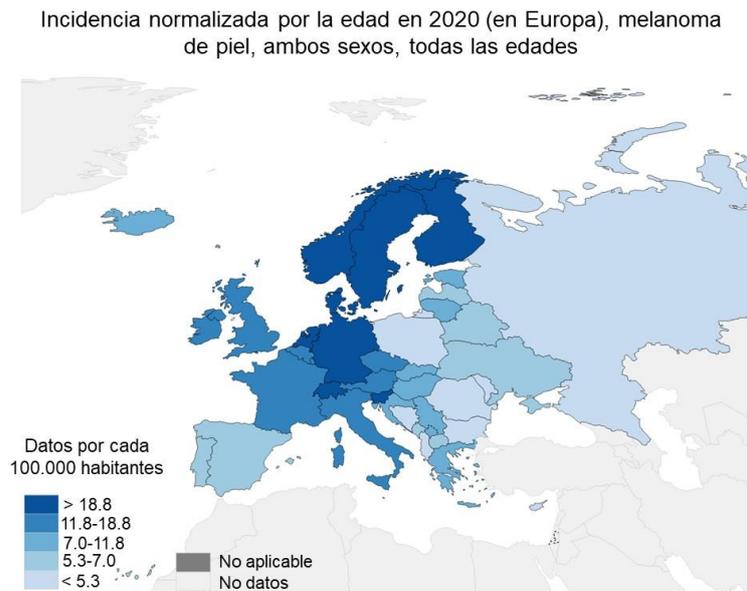


Figura 2.18. Datos estimados de las tasas de incidencia de melanoma de piel por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel de Europa. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

A pesar de que en España la incidencia de melanoma ha aumentado más de 10 veces en las últimas décadas, el país muestra una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por esta enfermedad en comparación con otros países europeos. Entre los lugares con las tasas de incidencias más altas se encuentran Navarra, Zaragoza, Tarragona, Granada, Mallorca, Murcia, Canarias, Albacete, Asturias y Cuenca, abarcando aproximadamente el 15% de la población del país. En España, al igual que en otros lugares del mundo, se ha observado un aumento en la tasa de mortalidad por melanoma en las últimas décadas, aunque a partir de los años 90 comenzó a estabilizarse. Esto posiblemente sea debido a un diagnóstico y tratamiento quirúrgico tempranos (Sáenz et al., 2005). La edad promedio de aparición del melanoma es aproximadamente a los 55 años, aunque puede variar según el grosor y el tipo histológico. Por ejemplo, los melanomas de extensión superficial, generalmente de menor grosor, suelen manifestarse en personas más jóvenes, mientras que los melanomas nodulares y los lentigos malignos tienden a afectar a individuos mayores. Además, la tasa de incidencia es muy parecida en hombres y mujeres (Sung et al., 2021).

2.2.2.4. Factores de riesgo

La principal causa del melanoma es la exposición a la radiación UV. Sin embargo, también existen otros factores de riesgo significativos como antecedentes familiares de la enfermedad, la cantidad de nevi (lunares), el fototipo de piel clara y la inmunosupresión.

Radiación UV

Estudios epidemiológicos han demostrado que la exposición intensa e intermitente a la radiación UV y las quemaduras solares, especialmente durante la infancia, son los factores de mayor riesgo para el desarrollo del melanoma (Leiter et al., 2014). Además, el uso de aparatos de bronceado artificial, como lámparas y cabinas de bronceado, que emiten radiación UV directamente sobre la piel, también se ha asociado con un significativo aumento del riesgo de melanoma, especialmente si se reciben múltiples sesiones y se inicia a una edad temprana (Dessinioti & Stratigos, 2022).

La radiación solar o luz solar se compone de las regiones del ultravioleta, infrarrojo y visible del espectro electromagnético. Los rayos UV son el componente más energético de la radiación solar y se dividen en UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) y UVC (200-290 nm) según su longitud de onda. Cuanto mayor es la longitud de onda de la radiación UV, mayor es su capacidad de penetrar en la piel, aunque su energía se reduce. La

mayoría de los rayos UVA y una parte de los rayos UVB llegan a la superficie terrestre, mientras que los rayos UVC son absorbidos por la atmósfera y la capa de ozono. No obstante, a pesar de que los rayos UVA tienen menor energía, pero pueden penetrar más en la piel, se ha demostrado que los rayos UVB son los responsables de causar el mayor daño cutáneo. Así pues, la investigación sobre los efectos de la radiación UV solar en la piel se ha centrado principalmente en los rayos UVA y UVB debido a su alcance y efectos (Mohania et al., 2017).

En 1992, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer determinó que la radiación solar, específicamente la radiación UV de la luz solar, es un carcinógeno humano. Cuando la radiación UV llega a la piel, es absorbida por moléculas fotosensibles conocidas como cromóforos. El ADN es un cromóforo directamente afectado por la radiación UVB, lo cual ocasiona la formación de fotoproductos como los dímeros de pirimidina de ciclobutano (CPD, *cyclobutane pyrimidine dimer*) y pirimidina 6-4 pirimidona. Aunque la maquinaria de reparación del ADN generalmente trata de corregir estos daños, los CPD y las pirimidinas 6-4 pirimidonas que no son reparados adecuadamente pueden originar mutaciones en las células de la piel, especialmente transiciones de las bases nitrogenadas C→T y CC→TT. Por otro lado, la radiación UVA, al llegar a la piel, tiene la capacidad de excitar cromóforos endógenos, generando especies reactivas de oxígeno que pueden causar daño oxidativo en el ADN, especialmente en las bases de guanina. Este daño conduce a la formación de 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG), una lesión que si no es reparada correctamente puede dar lugar a transversiones G→T y transiciones G→A en el ADN (Garibyan & Fisher, 2010).

Las mutaciones inducidas por la radiación UV en genes clave relacionados con la regulación del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y otras vías esenciales, son factores cruciales en la formación del melanoma. Los estudios realizados han demostrado que la luz UV es la responsable de causar mutaciones en genes importantes asociados al melanoma, como *CDKN2A*, *PTEN*, *TP53*, *KIT*, *TERT*, *NRAS* y *BRAF* (Loras et al., 2022).

Además, la radiación UV tiene un efecto inmunosupresor a nivel sistémico, debido a la producción de citoquinas proinflamatorias y supresoras que regulan a la baja la inmunidad mediada por células y alteran el número y función de las células de Langerhans en la piel. La radiación UV también ha sido asociada a la generación de células T reguladoras que suprimen la respuesta inmunitaria hacia antígenos específicos, creando un entorno propicio para el crecimiento de tumores de piel.

Estos hallazgos son cruciales para comprender los mecanismos por los cuales la radiación UV altera el sistema inmunitario y promueve el desarrollo del cáncer de piel a través de la inflamación y la inmunosupresión (Schwarz, 2008).

Antecedentes familiares

Alrededor del 15% de los casos de melanoma se presentan en individuos con historial familiar de la enfermedad, y algunos de estos pacientes tienen mutaciones heredadas en genes que aumentan la predisposición al melanoma. La mayoría de los melanomas hereditarios son causados por mutaciones en el gen *CDKN2A*, aunque en los últimos años se han identificado otros genes de susceptibilidad, incluidos *CDK4*, *RB1* y *MC1R* (Toussi et al., 2020).

Nevi melanocíticos

En aproximadamente el 25% de los casos, el melanoma surge de un lunar preexistente. Estos lunares o *nevi* melanocíticos son acumulaciones benignas de melanocitos que pueden estar presentes desde el nacimiento o adquirirse a lo largo del tiempo. Se ha observado una relación directa entre el riesgo de melanoma y el número total de *nevi* benignos en el cuerpo, ya sean de tipo displásico o no displásico (Bauer & Garbe, 2003). Por ejemplo, las personas con un número de *nevi* entre 11 y 25 tienen un riesgo aproximadamente 1.5 veces mayor que aquellas con 10 o menos, y este riesgo se duplica aproximadamente con cada incremento adicional de 25 *nevi*. De manera similar, tener *nevi* de gran tamaño (>5 mm) o *nevi* displásicos (con características citológicas atípicas) se asocia con un mayor riesgo de melanoma. De hecho, la presencia de varios *nevi* displásicos se conoce como el síndrome del *nevus* displásico, cuyos pacientes se caracterizan por tener varias lesiones con una dimensión de al menos 5 mm, con una apariencia plana, y muestran al menos 2 de las siguientes 3 características: pigmentación variable, contorno irregular y asimetría en sus bordes. Aunque los *nevi* displásicos generalmente no se convierten en melanoma, las personas que tienen una gran cantidad de estos lunares presentan un riesgo más alto que la población general de desarrollar melanoma (Drozdowski et al., 2023).

Características fenotípicas

Las personas con piel clara, cabello pelirrojo o rubio, pecas y dificultad para broncearse (fenotipo conocido como piel clara) tienen un mayor riesgo de desarrollar melanoma en comparación con otros tipos de pigmentación. Este fenotipo suele estar asociado genéticamente con la inactivación de polimorfismos en el gen *MC1R*. Se ha visto que ciertas variantes genéticas asociadas con estos fenotipos aumentan tanto el

riesgo de melanoma esporádico como el de melanoma en casos de predisposición familiar, debido principalmente a una menor protección contra la radiación UV (Abdel-Malek et al., 2014). Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el proceso de síntesis de feomelanina también puede contribuir al desarrollo de melanoma mediante un mecanismo independiente de la radiación UV, debido a los efectos carcinogénicos derivados de una elevada producción de especies reactivas de oxígeno (Mitra et al., 2012).

Además, como se ha comentado en el apartado anterior sobre la epidemiología del melanoma, la edad y el género son otros factores que pueden afectar al desarrollo del melanoma. Los datos actuales indican que el riesgo de melanoma aumenta con la edad, siendo más común en personas de mediana edad y mayores. Asimismo, aunque la incidencia es similar en hombres y mujeres, algunos estudios recientes han mostrado un mayor riesgo en hombres (Sung et al., 2021).

Inmunosupresión

La inmunosupresión ha sido relacionada con un mayor riesgo de desarrollar melanoma. Durante el crecimiento del tumor, se produce un microambiente inflamatorio debido a la liberación prolongada de diversos mediadores (como citoquinas, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, o prostaglandinas) por parte del tumor y/o las células del estroma. Estos mediadores inflamatorios inducen la migración, expansión y activación de células inmunosupresoras, especialmente las células mieloides supresoras (MDSC, *myeloid-derived suppressor cells*). La acumulación de MDSC se ha correlacionado con tumores de mayor tamaño y crecimiento más rápido. Estas células, altamente heterogéneas, se han asociado con la inhibición de respuestas antitumorales de células T debido a la producción de factores inmunosupresores como NO e iNOS. Además, otro mecanismo para bloquear las funciones de las células T mediado por las MDSC, está relacionado con una disminución en la expresión de la cadena ζ del receptor de células T, que juega un papel fundamental en el acoplamiento de dicho receptor y el reconocimiento de antígenos (Umansky & Sevko, 2012).

2.2.2.5. Bases moleculares del melanoma

En las últimas décadas, los avances en las técnicas de análisis genómico han permitido una comprensión más profunda de las alteraciones genéticas que impulsan el desarrollo del melanoma. Estos avances han revelado la presencia de múltiples genes mutados que desempeñan un papel significativo en diversas rutas de señalización importantes para la carcinogénesis y desarrollo del melanoma, como la ruta de MAPK,

la ruta de la proteína quinasa B (AKT), rutas relacionadas con el ciclo celular, así como otras rutas de señalización implicadas en los principales factores de transcripción.

Ruta de señalización dependiente de CDKN2A

La progresión descontrolada del ciclo celular es una característica notable en el desarrollo del cáncer, y se han identificado mutaciones germinales en varios elementos clave de este proceso que confieren predisposición al melanoma, como el inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A), la proteína del retinoblastoma (pRb), la ciclina D1 (CCND1) y la quinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6). Entre ellas, destacan las mutaciones en el gen *CDKN2A*, ya que representa aproximadamente el 40% de los melanomas familiares (Guo et al., 2021).

El gen *CDKN2A* codifica dos proteínas, p16^{Ink4a} y p14^{Arf}, que tienen una función supresora de tumores (**Figura 2.19**). La proteína p16^{Ink4a} inhibe al complejo (CDK4)/Ciclina D1), que a su vez afecta a la progresión del ciclo celular dependiendo de la proteína pRB. De manera similar, el ciclo celular se ve alterado por p14^{Arf}, ya que evita la degradación de la proteína p53 mediante inhibición de la actividad ubiquitina ligasa E3 de la proteína MDM2 (*murine doble minute 2*). Por lo tanto, las mutaciones en el gen *CDKN2A* inducen la deficiencia funcional tanto de p16^{Ink4a} como de p14^{Arf}, lo que conduce a una progresión descontrolada del ciclo celular al alterar la función de pRb y p53, respectivamente. En este sentido, las mutaciones inactivadoras de los genes supresores de tumores *RB1* y *TP53*, aunque se producen con menor frecuencia en melanoma, también promueven el desarrollo y la progresión de la enfermedad (Zeng et al., 2020).

Ruta de señalización dependiente de MAPK

La ruta de señalización MAPK regula la respuesta de las células a los estímulos extracelulares relacionados con la división celular y desempeña un papel central en la regulación del crecimiento, la supervivencia y la proliferación celular. Esta ruta se encuentra comúnmente activada en el cáncer con el objetivo de facilitar la rápida proliferación de las células tumorales. Cuando los factores de crecimiento se unen a los receptores tirosina quinasa (RTKs, *receptor tyrosine kinases*) en la superficie celular, se inicia una serie de eventos intracelulares secuenciales que involucran a RAS, RAF, MEK y ERK, los cuales regulan múltiples actividades biológicas relacionadas con el cáncer. En el contexto del melanoma, las mutaciones en componentes clave de esta ruta de señalización, que incluyen a *BRAF*, *NRAS*, *NF1* y *KIT*, son las responsables de la sobreactivación de la vía MAPK (**Figura 2.19**). Además, las mutaciones GNAQ /

GNA11 contribuyen a la hiperactivación de la ruta MAPK, sobre todo, en el melanoma de tipo uveal (melanoma ocular).

BRAF es una serina/treonina quinasa perteneciente a la familia de proteínas quinasas RAF. Es una familia compuesta por tres proteínas: ARAF, BRAF y CRAF, cuya activación depende de la formación de complejos por estas diferentes isoformas. Las tres proteínas participan en la transmisión de señales a través de la vía MAPK (Palmieri et al., 2015). En melanocitos, BRAF activa MEK, que a su vez activa ERK, el último componente de la cascada MAPK (**Figura 2.19**). El gen *BRAF* está mutado en un rango de 40% a 60% de los casos de melanoma, donde la mutación más común es la sustitución del ácido glutámico por valina en el codón 600 (*BRAF^{V600E}*), ocurriendo en aproximadamente 80% de los casos. La variante *BRAF^{V600E}*, al igual que otras mutaciones en el dominio quinasa de BRAF, conduce a una estimulación constante de la proliferación celular y el crecimiento tumoral a través de la activación de la fosforilación de ERK. Otras variantes, incluidas *BRAF^{V600K}*, *BRAF^{V600D}* y *BRAF^{V600R}*, ocupan alrededor del 12%, 5% y 1% de las mutaciones *BRAF*, respectivamente (Guo et al., 2021). Además, se ha demostrado que las mutaciones en el gen *BRAF* también se encuentran en *nevus* comunes, lo que sugiere que su activación oncogénica es un requisito necesario, pero no suficiente, para el desarrollo del melanoma (Pollock et al., 2003).

NRAS es una pequeña proteína de unión a GTP que pertenece a la familia RAS, la cual consta de tres isoformas: HRAS, KRAS y NRAS (Palmieri et al., 2015). En melanoma, las mutaciones en *KRAS* y *HRAS* se detectan con poca frecuencia, en alrededor del 5% de los pacientes, mientras que las mutaciones *NRAS* se encuentran en aproximadamente 25% de los casos, lo que convierte a *NRAS* en el segundo tipo de mutación más frecuente, después de *BRAF* (Lokhandwala et al., 2019). Además, debido a la fuerte afinidad de NRAS por interactuar con su proteína efectora BRAF en melanocitos, la activación de la ruta de señalización MAPK se lleva a cabo principalmente a través de la activación de BRAF en lugar de otras variantes de la proteína RAF, como CRAF (Fedorenko et al., 2013). Asimismo, NRAS es capaz de activar otras proteínas citoplasmáticas específicas aguas abajo, PI3K (**Figura 2.19**). Las mutaciones de *NRAS* suelen producirse en los sitios G12, G13 y Q61. La variante *NRAS^{Q61}* se encuentra en el 90% de los melanomas con mutaciones en *NRAS* y provoca una actividad constante de la enzima RAS-GTPasa, junto con cambios en su estructura hacia una forma activa unida a GTP. Mientras tanto, las mutaciones oncogénicas en los codones 12 o 13 afectan a los procesos de hidrólisis de GTP (Randic et al., 2021).

La neurofibromina 1 (NF1) es una proteína activadora de GTPasa que regula negativamente RAS al convertir el trifosfato de guanosina RAS activo (RAS-GTP) en el difosfato de guanosina RAS inactivo (RAS-GDP), inhibiendo así la señalización RAS descendente (Kiuru & Busam, 2017). El gen *NF1* ha sido identificado como el tercer gen mutado con mayor frecuencia en el melanoma después de *BRAF* y *NRAS*, representando el 10-15% de los casos (Davis et al., 2018). La mayoría de las mutaciones en el gen *NF1* son cambios genéticos que resultan en la pérdida de la función normal del gen. Estos cambios incluyen mutaciones sin sentido, mutaciones de cambio de marco de lectura, inserciones, deleciones y translocaciones (Kiuru & Busam, 2017). La deleción del gen *NF1* o la mutación inactivadora de *NF1*, provoca la activación de RAS al disminuir su actividad GTPasa intrínseca e induce la hiperactivación de la vía MAPK (**Figura 2.19**).

c-KIT es un receptor transmembrana tirosina quinasa que participa en rutas de señalización importantes en melanoma, incluida la ruta MAPK y PI3K/AKT (**Figura 2.19**). El ligando SCF (*stem cell factor*) de c-KIT es una citoquina que envía señales para mantener la supervivencia de las células hematopoyéticas, así como para promover la proliferación, diferenciación y regulación del crecimiento y desarrollo celular. Las mutaciones en el gen *KIT* se encuentran en aproximadamente el 3% de todos los melanomas. La mayoría de las mutaciones *KIT* en melanoma (alrededor del 70%) se localizan en dos exones específicos: el exón 11, donde predomina la mutación que cambia la leucina por prolina en el codón 576 (L576P), y el exón 13, donde es más común la mutación que reemplaza la lisina por ácido glutámico en el codón 642 (K642E). Ambas mutaciones resultan en la activación constante de la actividad tirosina quinasa de la proteína c-KIT, lo que a su vez desencadena las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT (Pham et al., 2020).

Ruta de señalización dependiente de PI3K/AKT

La activación de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K, *phosphatidylinositol-3-kinase*) conduce a la formación de fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3, *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) mediante la fosforilación del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP2, *phosphatidylinositol-4,5-diphosphate*) en la membrana plasmática. PIP3 es esencial para el reclutamiento de la proteína quinasa AKT en la membrana plasmática, lo que permitirá su posterior fosforilación y activación (**Figura 2.19**).

AKT pertenece a una familia de serina/treonina quinasas compuesta por tres isoformas altamente homólogas: AKT1, AKT2 y AKT3. La activación de AKT permite regular procesos celulares importantes, como la apoptosis, la reparación del ADN, el

ciclo celular, el metabolismo de la glucosa, la proliferación, la invasión y la angiogénesis (Nicholson & Anderson, 2002). En melanoma, se ha demostrado que AKT3 es la isoforma predominante (Stahl et al., 2004). Además, uno de los efectores de AKT es mTOR, una proteína que se encuentra mutada en aproximadamente el 10% de los melanomas (Kong et al., 2016). En este sentido, la estimulación excesiva de la ruta PI3K/AKT mediante mutaciones activadoras de PI3K, AKT o mTOR, así como de los elementos aguas arriba de la ruta (RAS, RKTs o c-KIT), provoca un crecimiento descontrolado de las células tumorales.

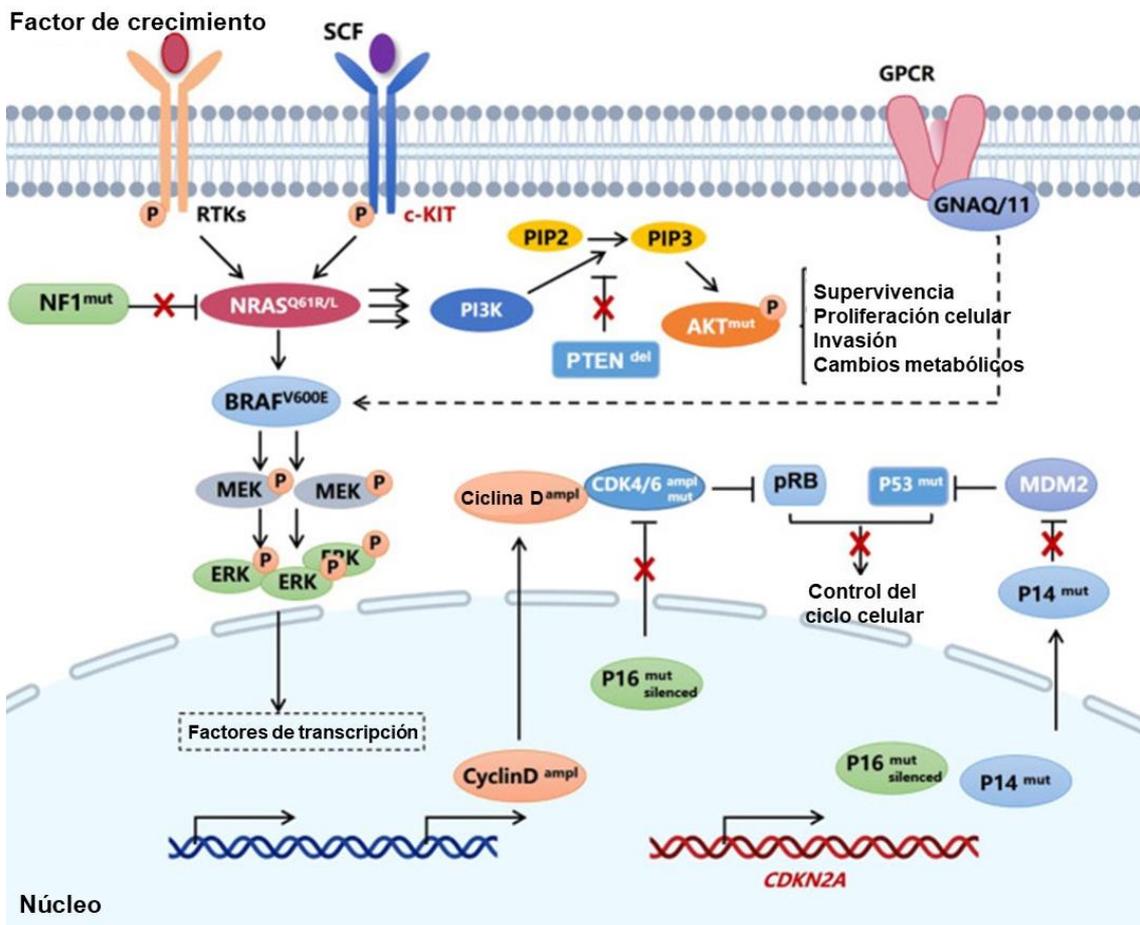


Figura 2.19. Mutaciones en genes clave y las vías de señalización subsiguientes en el desarrollo del melanoma. Ampl: amplificación, AKT: proteína quinasa B, CDK: quinasa dependiente de ciclina, CDKN2A: inhibidor de quinasa 2A dependiente de ciclina, Del: delección, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GPCR: receptor acoplado a proteína G, MEK: quinasa activada por mitógenos que activa a ERK, Mut: mutación, P (en un círculo): fosfato, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PIP2: fosfatidilinositol-(4,5)-difosfato, PIP3: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato, PTEN: homólogo de fosfatasa y tensina, pRB: proteína del retinoblastoma, RTK: receptor de tirosina, SCF: factor de células madre. Imagen traducida de Guo et al., 2021.

PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted in from chromosome ten*) también es un elemento importante en la ruta de señalización dependiente de PI3K/AKT. PTEN es una proteína supresora de tumores que convierte el PIP3 nuevamente en PIP2, lo que le permite actuar como un regulador negativo de la ruta PI3K/AKT (**Figura 2.19**). La pérdida de función del gen *PTEN* da como resultado la activación constante de AKT y se ha asociado en gran medida con el desarrollo de tumores en el melanoma maligno (Ince et al., 2022).

Ruta de señalización dependiente de Notch

La ruta de señalización Notch está implicada en la autorenovación de células madre, la diferenciación celular y las decisiones sobre el destino celular en diversos órganos (Andersson & Lendahl, 2014). Notch es un receptor de señales extracelulares que pertenece a una familia de proteínas transmembranales tipo 1 compuesta por dos dominios principales, el dominio Notch extracelular (NECD, *Notch extracellular domain*) y el dominio Notch intracelular (NICD, *Notch intracellular domain*). Cuando el ligando interactúa con el receptor Notch, se desencadena una serie de procesos proteolíticos que resultan en la liberación del dominio NICD, que pasa al núcleo y se asocia con la proteína de unión al ADN CSL (*CBF1/suppressor of hairless/LAG-1*) junto con la proteína MAML (*mastermind-like protein*) para activar la transcripción de los genes diana de Notch (**Figura 2.20**).

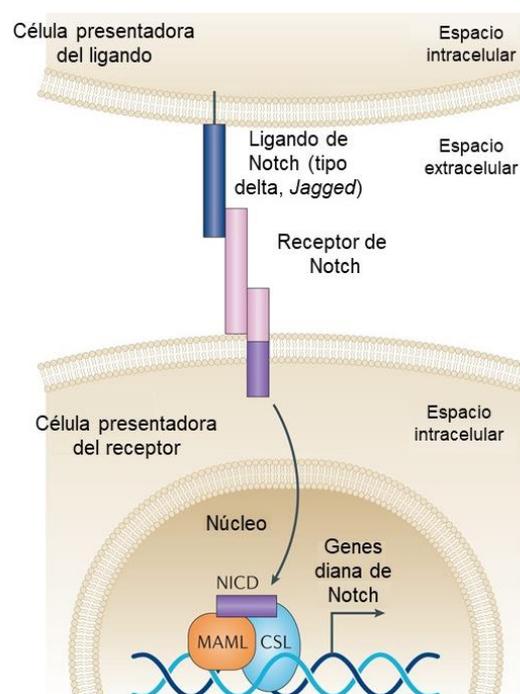


Figura 2.20. Vía de señalización de Notch. CSL: proteína *CBF1/Suppressor of Hairless/LAG-1*, MAML: proteína *mastermind-like*, NICD: dominio intracelular de Notch. Imagen traducida de Andersson & Lendahl, 2014.

Notch es esencial para mantener la homeostasis de los melanocitos y, su expresión y actividad son significativamente más elevadas en las células de melanoma. De hecho, se ha observado que los melanocitos modificados genéticamente para expresar una forma de Notch con mayor actividad, exhiben un aumento en la proliferación celular y muestran características malignas similares al melanoma (Pinnix et al., 2009). Además de su efecto intrínseco en el comportamiento de las células de melanoma, la activación de Notch también está fuertemente asociada con la angiogénesis y facilita la comunicación entre las células tumorales y las células endoteliales, promoviendo así la migración del tumor (Murtas et al., 2015). Asimismo, estudios recientes han demostrado que la activación de Notch puede inducir resistencia a inhibidores de MEK en células de melanoma con mutaciones en *BRAF* (Porcelli et al., 2021).

Rutas de señalización dependientes de Wnt

Las rutas de señalización Wnt (*wingless-related integration site*) se inician mediante proteínas que transmiten señales a una célula a través de receptores en su superficie celular. Se han identificado como rutas principales de señalización Wnt, la ruta canónica de Wnt, la ruta de polaridad celular plana no canónica y la ruta no canónica de Wnt/calcio. Las tres rutas se activan cuando un ligando de la proteína Wnt se une a un receptor de la familia Frizzled, transmitiendo la señal biológica hacia el interior de la célula a través de la proteína DVL (*Disheveled*). La ruta canónica de Wnt/ β -catenina regula procesos como la regeneración de tejidos, la diferenciación de células madre y la proliferación celular. Por otro lado, las rutas no canónicas de polaridad celular plana y de Wnt/calcio regulan el citoesqueleto y los niveles de calcio intracelulares, respectivamente (Liu et al., 2022).

En melanoma, destaca la ruta canónica de Wnt, ya que β -catenina tiene un papel fundamental en el desarrollo de los melanocitos (Kovacs et al., 2016). Cuando se activa el receptor Frizzled se bloquea la acción del complejo formado por las proteínas AXIN, GSK3 β , CK1 α y APC por medio de la proteína DVL. Esto permite que β -catenina no sea fosforilada y pueda migrar al núcleo para asociarse con los factores TCF (*T cell-specific factor*) y LEF (*lymphoid enhancer-binding factor*), lo que conduce a la activación de genes diana Wnt importantes en la carcinogénesis, incluidos *c-MYC* y *CCND1*. Sin embargo, en ausencia del ligando de Wnt, la proteína DVL no inhibe la acción del complejo formado por AXIN, CK1 α , GSK3 β y APC, el cual fosforila a β -catenina, lo que conduce a su ubiquitinación y posterior degradación en el proteasoma (**Figura 2.21**).

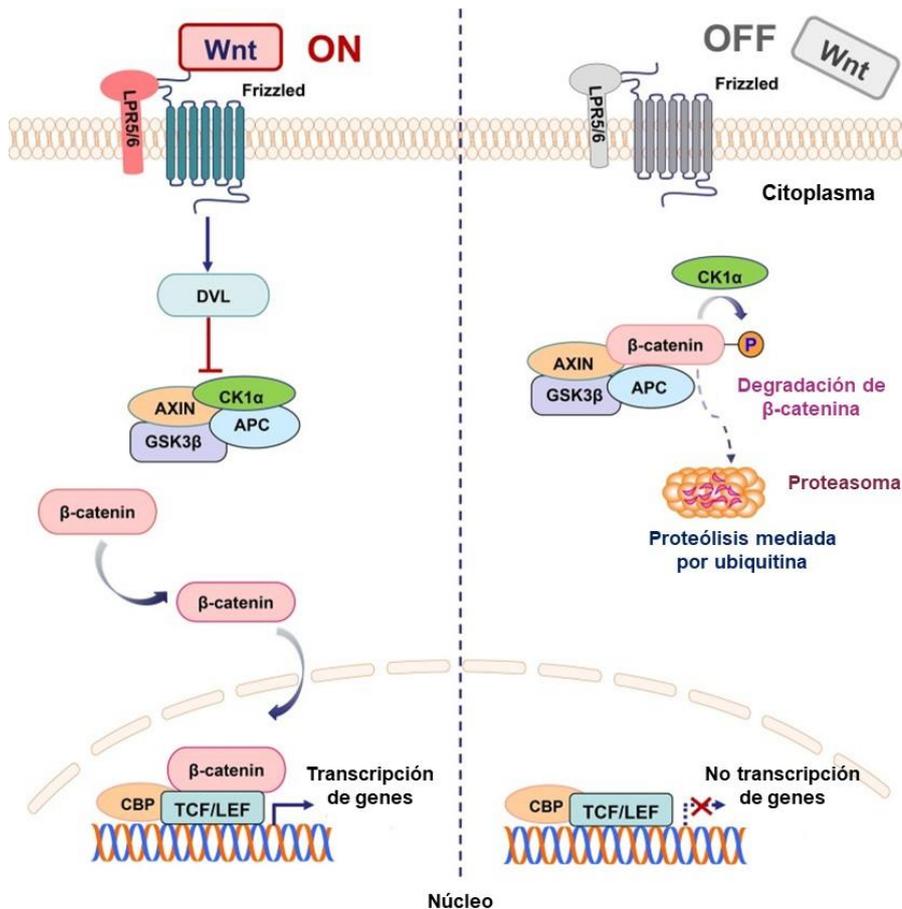


Figura 2.21. Esquema de la vía Wnt/ β -catenina activada e inhibida. APC protein: proteína *adenomatous polyposis coli*, CBP: proteína de unión a CREB, CK1 α : caseína quinasa 1-alfa, DVL protein: proteína *disheveled*, GSK3 β : glucógeno sintasa quinasa 3-beta. Imagen traducida de Zhang & Wang, 2020.

Además, la ruta Wnt/ β -catenina ejerce un papel importante en el sistema inmunitario. Diversas investigaciones han demostrado que la evasión inmune inducida por β -catenina se encuentra en el 13% de todos los tumores (Pai et al., 2017) y en el 42% de los melanomas cutáneos (Nsengimana et al., 2018). En un estudio reciente realizado por Waaler y colaboradores, se ha desarrollado un inhibidor específico de la tanquirasa, G007-LK, que disminuye la señalización Wnt/ β -catenina en modelos de melanoma murino y sensibiliza los tumores al tratamiento con inhibidores de PD-1 (Waaler et al., 2020). La tanquirasa es una proteína que controla la degradación de AXIN mediante poli-ADP-ribosilación. De esta forma, la tanquirasa es capaz de promover la proteólisis de AXIN e inhibir la acción del complejo formado por AXIN, CK1 α , GSK3 β y APC, favoreciendo así la estabilización de β -catenina. Por tanto, la inhibición de la tanquirasa puede ser considerada como una estrategia terapéutica para superar la resistencia provocada por β -catenina al bloqueo de los puntos de control inmunitario en melanoma. Durante esta Tesis Doctoral se ha realizado una estancia de tres meses en el laboratorio

del profesor Waaler para estudiar el efecto de un nuevo inhibidor de la tanquirasa (OM-153) sobre las células de melanoma, así como su efecto en combinación con inhibidores de PD-1 en modelos experimentales de melanoma en ratones.

MITF: Factor de transcripción clave en el desarrollo del melanoma

Existen múltiples factores de transcripción que están implicados en las características malignas de las células de melanoma, incluidos MITF, SOX10, CREB, cFOS, MYC, p53 y BRN2. Las mutaciones y alteraciones no genéticas de estos factores de transcripción provocan una desregulación transcripcional que beneficia a las células de melanoma al permitirles crecer en diferentes situaciones de estrés y, en consecuencia, diseminarse a órganos distantes (Gupta et al., 2020). Sin embargo, el factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF, *microphthalmia-associated transcription factor*) representa el principal factor de transcripción específico del linaje melanocítico cuyo papel está profundamente extendido en el melanoma maligno.

La historia del descubrimiento de MITF comienza en 1942, cuando Paula Hertwig observó que la descendencia de un ratón irradiado con rayos X presentaba ojos anormalmente pequeños (microftalmia) y pérdida de pigmentación. Este fenómeno permitió la identificación del locus mutante que inicialmente se denominó "m", luego se amplió a "mi" y finalmente se identificó como "Mitf" (Kawakami & Fisher, 2017). En 1992, Heinz Arnheiter, mediante la inserción de un transgén en el locus *mi* en ratones, observó un fenotipo albino con ojos pequeños, pérdida de audición y un defecto grave en los mastocitos (Arnheiter, 2010; Hodgkinson et al., 1993). Esto indicó que un solo gen contenido en el locus *mi* tenía un papel fundamental en varios procesos fisiológicos relacionados con la cresta neural y los tejidos derivados del neuroepitelio, incluyendo la pigmentación de la piel, la audición y el desarrollo de los ojos. Poco después, en 1994, fue clonado el homólogo humano *MITF* (Tachibana et al., 1994), lo que permitió evidenciar que la diversidad de funciones específicas de los tejidos se debía a diferentes isoformas de Mitf/MITF, todas transcritas desde el mismo locus (Tachibana, 2000). Asimismo, se identificaron mutaciones de pérdida de función en el gen *MITF* como la causa del síndrome de Waardenburg tipo IIA en seres humanos, el cual se caracteriza por la presencia de ojos pequeños, hipopigmentación y pérdida de audición (Tassabehji et al., 1994).

A nivel molecular, MITF es un factor de transcripción con un dominio hélice-bucle-hélice básico de cremallera de leucina (bHLH-ZIP, *basic helix-loop-helix leucine zipper*) que pertenece a la familia de factores de transcripción Mit/TFE, junto con TFEB, TFEC y TFE3 (Hemesath et al., 1994). Además, MITF es capaz de unirse a las regiones

promotoras de sus genes diana mediante el reconocimiento de la secuencia 5'-CANNTG-3', conocida como secuencia E o "E-box" (donde C = citosina; A = adenina; T = timina; G = guanina; N = cualquier nucleótido). El gen *MITF* presenta diversas isoformas (**Figura 2.22**), debido a que la transcripción de los diferentes promotores, así como el proceso de empalme alternativo, da lugar a productos genéticos con diferencias principalmente en el primer exón. En melanoma, destaca la isoforma MITF-M, ya que se expresa específicamente en el linaje de los melanocitos, donde controla la propagación de los melanoblastos en el desarrollo temprano (Opdecamp et al., 1997), así como melanogénesis en melanocitos adultos mediante la regulación de genes como *TYR* (Yasumoto et al., 1994).

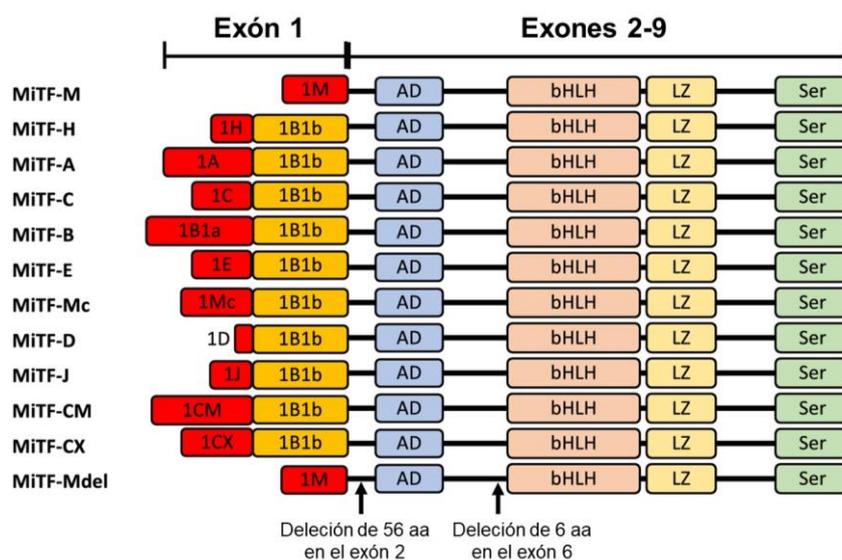


Figura 2.22. Diferentes isoformas de MITF. Imagen traducida de Opezzo & Rosselli, 2021.

La regulación de la expresión de MITF-M es un proceso complejo y dinámico que ocurre a diferentes niveles. A nivel transcripcional, se conocen diversos reguladores positivos (LEF-1/TCF, SOX10, PAX3, CREB, OC-2) y represores (BRN2, ATF4, JUN, ALX3, GLI2) que se unen al promotor específico de MITF-M en melanocitos (**Figura 2.23**).

Entre los reguladores positivos, el factor de transcripción llamado LEF-1/TCF, que forma parte de la ruta de señalización de la Wnt/ β -catenina, juega un papel activador en el promotor de MITF-M (Yasumoto et al., 2002). Los factores de transcripción SOX10 y PAX3 son capaces de unirse directamente al promotor de MITF-M y promover su expresión. Significativamente, la actividad transcripcional de SOX10 se inhibe mediante la fosforilación mediada por ERK (Han et al., 2018). PAX3 a su vez es inhibido por la señalización de TGF- β (Nishimura et al., 2010). Además, el factor de transcripción de

homeodominio cortado ONECUT-2 (OC-2) también actúa como un estimulador de la actividad del promotor MITF-M. Otro factor de transcripción relevante es CREB, ya que permite que la expresión de MITF-M responda a niveles elevados de AMPc aguas abajo del receptor MC1R, que está implicado en el control de la pigmentación del cabello y la piel. Además, CREB requiere de los coactivadores p300/CBP. Estas proteínas, que actúan como histona acetiltransferasas, interactúan también con MITF-M y colaboran en la regulación de algunos de sus genes diana (Wang et al., 2018).

Dentro de los reguladores negativos, el factor de transcripción FOXD3 tiene la capacidad de inhibir la expresión de MITF-M al bloquear la interacción entre su promotor y PAX3 (Thomas & Erickson, 2009). El factor de transcripción GLI2, uno de los efectores de la señalización de Hedgehog, que también participa en la vía TGF- β /SMAD, actúa como un represor de la expresión de MITF-M (Javelaud et al., 2011). Otro represor importante es ATF4, un factor de transcripción que puede reprimir la expresión del ARN mensajero (ARNm) de MITF (Falletta et al., 2017), supuestamente a través de la competencia con CREB por la unión a CRE (Ferguson et al., 2017). Además, DEC1 destaca por ser un factor de transcripción que reprime la expresión de MITF-M en condiciones de hipoxia (Feige et al., 2011). Asimismo, algunos estudios han caracterizado al factor de transcripción ALX3 como un supresor de la expresión de MITF-M (Mallarino et al., 2016). En cuanto al factor de transcripción BRN2, se ha observado que regula tanto hacia arriba (Wellbrock et al., 2008) como hacia abajo (Goodall et al., 2008) la expresión de MITF en células de melanoma.

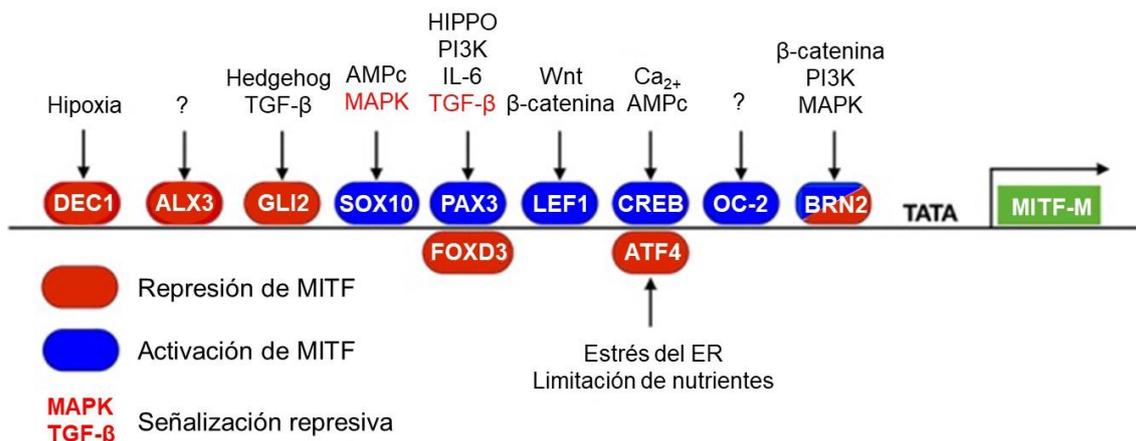


Figura 2.23. Diagrama esquemático de los factores de transcripción que regulan positiva o negativamente el promotor MITF-M y su respuesta a las vías de señalización. ER: retículo endoplásmico, MAPK: quinasa activada por mitógenos, TGF- β : factor de crecimiento transformante beta. Imagen traducida de Goding & Arnheiter, 2019.

La expresión de MITF-M también se ve afectada por la regulación de varios microARN (miARN). Se ha observado que la sobreexpresión del miARN-101 es capaz de reducir los niveles de proteína MITF, así como suprimir la invasión y la proliferación de las células de melanoma (Luo et al., 2013). En líneas celulares de melanoma, se ha observado una correlación inversa entre la expresión de MITF y el miARN-218, lo que sugiere que el miARN-218 regula negativamente a MITF-M (Guo et al., 2014). Además, el miARN-182 promueve la migración de las células de melanoma mediante la inhibición directa de la expresión de MITF-M (Segura et al., 2009). Otros ejemplos serían los miARN-137 y miARN-148, que regulan negativamente la expresión de MITF-M (Bemis et al., 2008; Hafliadótir et al., 2010). En definitiva, se han identificado diversos miARN que pueden modular la expresión de MITF, lo que a su vez afecta a la supervivencia y al fenotipo invasivo de las células de melanoma.

Asimismo, los ARN largos no codificantes (lncARN) han emergido como actores importantes en el desarrollo y la progresión del cáncer, incluido el melanoma (Iyer et al., 2015; Yan et al., 2015). Si bien las funciones moleculares de la mayoría de los lncARN siguen siendo poco conocidas, varios estudios han observado que contribuyen a múltiples aspectos de la expresión génica (Kopp & Mendell, 2018; Vance & Ponting, 2014). Por ejemplo, la señalización oncogénica BRAF^{V600E} regula la expresión de 109 supuestos lncARN, como BANCER, que funciona como un oncogén de melanoma para activar programas de expresión génica que controlan la migración celular (Flockhart et al., 2012). Otro lncARN, MIR31HG, induce la senescencia dependiente de p16^{Ink4a} en respuesta a la expresión de BRAF^{V600E} (Montes et al., 2015), mientras que el lncARN conocido como SAMMSON es necesario para la proliferación y supervivencia del melanoma. La inhibición dirigida de SAMMSON altera la función mitocondrial y aumenta la respuesta a los fármacos inhibidores de MAPK en modelos de melanoma de xenoinjerto derivados de pacientes (Leucci et al., 2016). Además, el lncARN conocido como DIRC3, el cual está regulado por los factores de transcripción MITF y SOX10, actúa como un supresor de tumores en melanoma (Coe et al., 2019).

A nivel postraducciona, MITF-M es objeto de numerosas modificaciones (**Figura 2.24**), entre ellas sumoilación, ubiquitinación y acetilación, que contribuyen a la regulación de la expresión y actividad de MITF-M. Se ha observado que la sumoilación en las posiciones K182 y K316 disminuye la capacidad de MITF-M para activar algunos de sus genes diana, como *TRPM1* (Miller et al., 2005). La sumoilación de MITF-M adquirió una gran importancia cuando se descubrió que la mutación recurrente de la línea germinal E318K, que interfiere con la sumoilación de MITF-M en la ubicación K316, aumenta la predisposición al melanoma y al carcinoma renal, estableciendo una

conexión entre MITF-M y el melanoma hereditario (Bertolotto et al., 2011). Desde una perspectiva funcional, la mutación E318K conduce a un aumento en la unión de MITF-M a un conjunto específico de genes diana, lo que resulta en una regulación transcripcional diferencial. Sin embargo, aún se necesita un análisis funcional en profundidad para comprender completamente por qué esta mutación única tiene un impacto tan significativo en el desarrollo del melanoma. Asimismo, se ha observado que la ubiquitinación en la posición K201 desencadena la degradación de MITF-M (Xu et al., 2000). Además de la sumoilación y la ubiquitinación, se ha identificado que otros residuos de lisina en MITF-M, como K206 y K243, son objeto de acetilación (Cheli et al., 2010). Al igual que la sumoilación, la acetilación podría influir en la activación de algunos de los genes diana regulados por MITF-M.

En cuanto a los eventos de fosforilación (**Figura 2.24**), el más estudiado es el que tiene lugar en el residuo de Ser73, identificado en 1998 (Hemesath et al., 1998). Este proceso de fosforilación es mediado por la proteína ERK y afecta a la interacción entre MITF-M y p300, lo que produce efectos sobre la activación de la transcripción. La fosforilación en la Ser409 por la quinasa p90/RSK permite la fosforilación por la quinasa GSK3 β (*glycogen synthase kinase-3 β*) en Ser405, Ser401 y Ser397, cuyo efecto parece desestabilizar la proteína MITF-M (Ploper et al., 2015). También se ha observado que GSK3 β fosforila en la posición Ser298 de MITF-M, provocando una mayor unión de MITF al promotor de *TYR* (Takeda et al., 2000). Además, se ha demostrado que la fosforilación de la Ser307 en MITF-M conduce a un aumento en la expresión génica específica de los osteoclastos (Mansky et al., 2002).

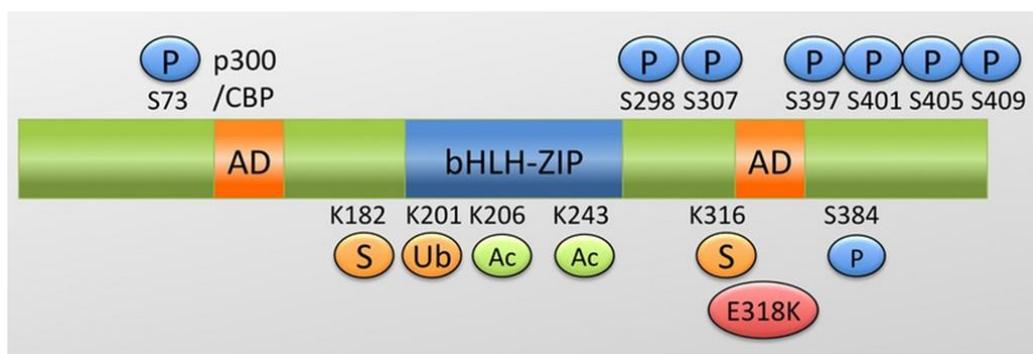


Figura 2.24. Principales modificaciones postraduccionales de la proteína MITF-M. Se incluyen fosforilaciones (P), sumoilaciones (S), ubiquitinaciones (Ub) y acetilaciones (Ac), así como la mutación E318K. Imagen obtenida de Wellbrock & Arozarena, 2015.

En este sentido, las mutaciones que dirigen el inicio y desarrollo del melanoma, junto con la alteración del microambiente tumoral, provocan una desregulación de la expresión de MITF-M, de sus modificaciones postraduccionales y de su actividad,

de forma que la capacidad de MITF-M para coordinar el amplio rango de procesos celulares queda alterada (Goding & Arnheiter, 2019).

El factor de transcripción MITF-M (para simplificar, MITF) es considerado como el regulador maestro de los melanocitos, así como un factor clave en la biología del melanoma. MITF desempeña un papel fundamental en el desarrollo de los melanocitos, regulando funciones como la diferenciación, la supervivencia, la reparación del daño en el ADN, el metabolismo, la proliferación, la biogénesis de lisosomas, la invasión y la senescencia (**Figura 2.25**).

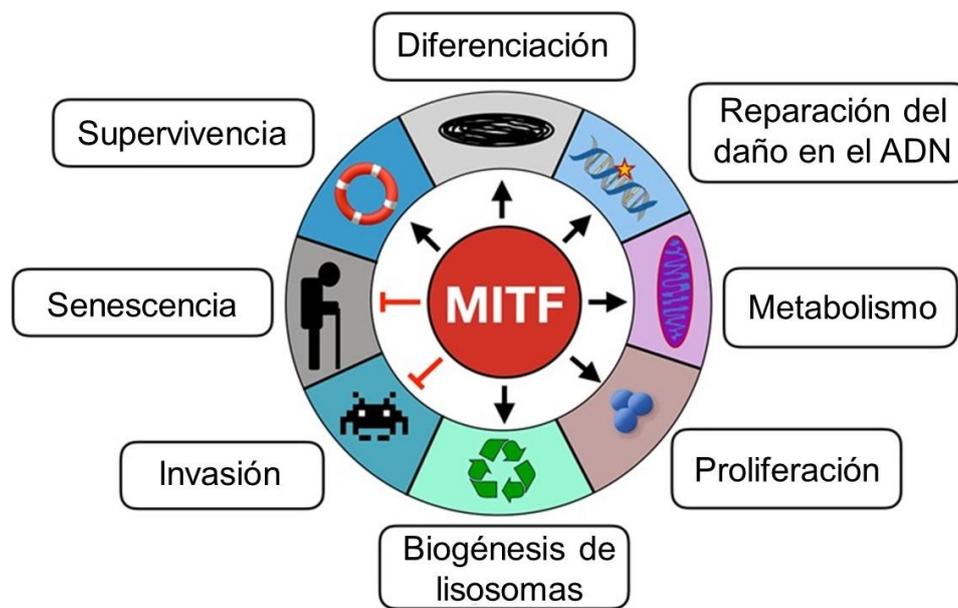


Figura 2.25. Principales funciones biológicas de MITF. Imagen traducida de Goding & Arnheiter, 2019.

Durante el desarrollo, MITF es esencial para garantizar la supervivencia de los melanoblastos (Hodgkinson et al., 1993). La ausencia de una proteína MITF funcional provoca que los melanoblastos experimenten una muerte celular programada, posiblemente por apoptosis, en aproximadamente dos días (Nakayama et al., 1998). Esto puede deberse a que MITF actúa como un regulador positivo de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (McGill et al., 2002). También cabe resaltar que MITF controla la actividad de DICER, una ribonucleasa implicada en el proceso de biogénesis de ARN de interferencia (ARNi) y ARNm maduro, esenciales para la regulación de la expresión génica y, en consecuencia, para el desarrollo y supervivencia de los melanocitos (Levy et al., 2010). Además, MITF tiene la capacidad de promover funciones relacionadas con la diferenciación, incluida la regulación de genes implicados en la pigmentación como *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *MLANA/MART-1*, *SILV* y *SLC24A5* (Cheli et al., 2010) o la adhesión celular como *CEACAM1* (Ullrich et al., 2015).

El papel de MITF en la proliferación celular ha sido objeto de debate, ya que inicialmente algunos grupos de investigación afirmaban que MITF tenía un efecto pro-proliferativo (Widlund et al., 2002), mientras que otros estudios defendían que MITF tenía un efecto anti-proliferativo (Carreira et al., 2005). Para resolver esta aparente paradoja, se propuso lo que se conoce como el "modelo de reóstato" para la función de MITF (Carreira et al., 2006). Aunque se describe mejor más adelante (apartado 2.2.2.9. Importancia del microambiente tumoral, heterogeneidad y plasticidad celular en la resistencia a terapias en melanoma), este modelo asocia los niveles bajos de MITF con desdiferenciación, aumento de la invasión y niveles elevados de la proteína inhibidora 1B de la quinasa dependiente de ciclina p27 (CDKN1B) y, por lo tanto, proliferación reducida. En cambio, las células con altos niveles de MITF se caracterizan por ser células diferenciadas, que también pueden experimentar una parada del ciclo celular debido al aumento de la expresión de p21 (CDKN1A) (Carreira et al., 2005) y p16^{INK4a} (CDKN2A) (Loercher et al., 2005) siempre que *CDKN2A* no esté inactivado, como es comúnmente observado en el melanoma (Bennett, 2016). Por lo tanto, aumentar la actividad de MITF desde niveles bajos puede promover la proliferación al reducir la expresión de p27, pero aumentar aún más la actividad de MITF puede provocar una parada del ciclo celular mediada por p21/p16. Además, las células que muestran niveles intermedios de MITF expresan genes de ambos estados y, por tanto, están dotadas de propiedades tanto invasivas como proliferativas.

En relación con la capacidad de invasión, se ha demostrado que MITF ejerce control sobre la expresión de la guanosina monofosfato reductasa, lo que resulta en un aumento de los niveles intracelulares de GTP cuando se reduce la presencia de MITF (Bianchi-Smiraglia et al., 2017). Esto es importante ya que los niveles elevados de GTP conducen a la activación de RAC1, RHO-A y RHO-C, reguladores clave del citoesqueleto de actina. Junto con la capacidad de MITF para regular *DIAPH1* (Carreira et al., 2006), un gen involucrado en la polimerización de actina, estas observaciones indican que una disminución de MITF puede favorecer la promoción de la invasión celular.

Recientemente, MITF ha sido relacionado con la activación del complejo V-ATPasa, responsable de regular la acidificación de diferentes orgánulos celulares, entre ellos los lisosomas y los endosomas (Zhang et al., 2015). Asimismo, MITF también promueve la expresión de genes relacionados con la biogénesis de los lisosomas (Ploper et al., 2015). Al controlar la función de los lisosomas, el complejo V-ATPasa también aumenta la actividad del mTORC1 unido al lisosoma que promueve la síntesis global de proteínas, necesaria para la proliferación celular (Zoncu et al., 2011). Otros estudios recientes han identificado a MITF en el melanoma como un regulador de un grupo

específico de genes relacionados con la autofagia (Möller et al., 2019), un proceso celular que depende de los lisosomas y que se encarga de degradar y reciclar orgánulos no deseados. Esto podría representar una estrategia crucial de supervivencia celular, especialmente cuando hay restricción de nutrientes. Además, se ha observado que MITF es capaz de modificar la configuración metabólica de las células. En concreto, MITF desempeña un papel activador en la regulación de PGC1 α , que controla la biogénesis de las mitocondrias (Vazquez et al., 2013).

El potencial de MITF para influir en la biología de los melanocitos y el melanoma mediante la regulación del metabolismo también se ejemplifica a través de su capacidad para estimular la expresión del gen *SIRT1*. Este gen codifica una desacetilasa clave dependiente de NAD que es importante para promover la proliferación y la supresión de la senescencia (Ohanna et al., 2014). Aunque la invasión representa una respuesta inmediata de los niveles bajos de MITF, una disminución prolongada de MITF conduce a la senescencia asociada con una parada irreversible del crecimiento (Strub et al., 2011), posiblemente debido también a un mayor daño en el ADN (Ballotti et al., 2020).

En procesos relacionados con la replicación del ADN, reparación de daños y preservación de la integridad cromosómica, MITF también regula un conjunto significativo de genes. En particular, se ha observado que los niveles reducidos de MITF se asocian con un aumento de los focos γ H2AX, que indican la presencia de daños en el ADN (Giuliano et al., 2010). Aunque no queda claro como MITF evita el daño del ADN, puede estar vinculado a su capacidad para regular varios factores de reparación, incluidos BRCA1, LIG1, RAD54, RAD51L3, y la telomerasa codificada por *TERT1* (Strub et al., 2011).

Además, MITF también es considerado como un mediador central en la modulación de la respuesta inmune en melanoma (**Figura 2.26**). Se ha observado que MITF es capaz de reducir la secreción de moléculas inflamatorias y la heterogeneidad tumoral, lo que mejora el reconocimiento de células T y la inmunovigilancia. Al regular la expresión de las enzimas reparadoras del ADN, MITF también podría participar en la formación de neoantígenos. Por el contrario, MITF puede promover la supresión del sistema inmunitario mediante la interacción con el receptor HVEM (*Herpesvirus entry mediator*), que inhibe una respuesta inmunológica efectiva, el aumento de la expresión del receptor tirosina quinasa MET, que atrae a los neutrófilos, y la disminución de la expresión de la proteína IRF4 (*interferon regulatory factor 4*), que inhibe la maduración de las células B.

Asimismo, MITF controla la transcripción de un conjunto de genes, incluidos *MLANA/MART-1*, *TYR* y *PMEL17*, que codifican proteínas que se exponen en la superficie celular y actúan como antígenos de tumores (Ballotti et al., 2020). Los antígenos son reconocidos por las células del sistema inmune y su presentación se lleva a cabo mediante células presentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*), siendo las más importantes las células dendríticas (DC, *dendritic cells*), las células B y los macrófagos. En particular, algunas células tumorales, incluidas las células de melanoma, también pueden considerarse APC. Por tanto, cambios en los niveles de MITF afectan a la expresión y el procesamiento de antígenos de superficie y, en consecuencia, al reconocimiento de las células de melanoma por parte del sistema inmunitario.

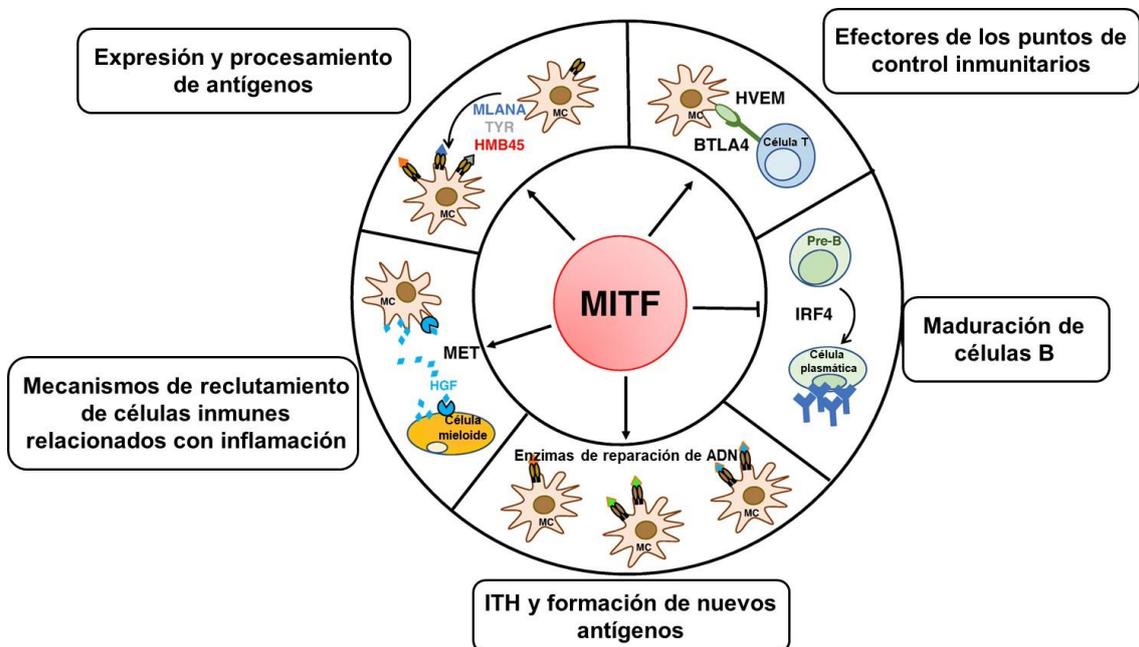


Figura 2.26. Esquema resumido de las características de la relación de MITF con el sistema inmunitario a nivel transcripcional. BTLA: atenuador de linfocitos B y T, CCL: ligando de quimioquina (motivo C-C), HGF: factor de crecimiento de hepatocitos, HVEM: mediador de entrada de herpesvirus, IFN: interferón, IL: interleucina, IRF4: factor 4 regulador de interferón, MC: melanocitos, MET: transición mesénquima-epitelio, TNF- α : factor de necrosis tumoral alfa, TYR: tirosinasa. Imagen traducida de Ballotti et al., 2020.

2.2.2.6. Diagnóstico del melanoma

El diagnóstico temprano del melanoma es clave para asegurar un pronóstico favorable. De hecho, la supervivencia en casos de melanoma no invasivo es aproximadamente del 90-95%. Sin embargo, en sus formas invasivas, el melanoma tiene altas tasas de mortalidad, con una supervivencia inferior al 20% cuando se ha

diseminado a otros órganos. En este sentido, detectar y extirpar el melanoma en sus etapas iniciales garantiza una buena perspectiva para el paciente, pero requiere un seguimiento regular y una minuciosa revisión cutánea.

En 1985, estudios sobre la detección temprana del melanoma maligno establecieron el acrónimo “ABCD” como una regla sencilla que permite evaluar las diferentes características de los lunares para la identificación de melanomas precoces (Friedman et al., 1985). Según esta regla, los melanomas suelen caracterizarse por ser Asimétricos (no se dividen en dos mitades iguales), tener Bordes irregulares, mostrar Color en diferentes áreas de la lesión (tonos bronce, café, negro y, en ocasiones blanco, rojo o azul) y superar los 6 mm de Díámetro. Posteriormente, se agregó la letra “E” a esta regla, haciendo referencia a la Evolución, es decir, al cambio de la lesión con el tiempo (**Figura 2.27**). No obstante, durante la etapa temprana de desarrollo del melanoma, es posible que uno o más de los criterios ABCDE estén ausentes, siendo el más comúnmente ausente el “D”, ya que en raras ocasiones se han descrito melanomas con un diámetro igual o inferior a 6 mm.

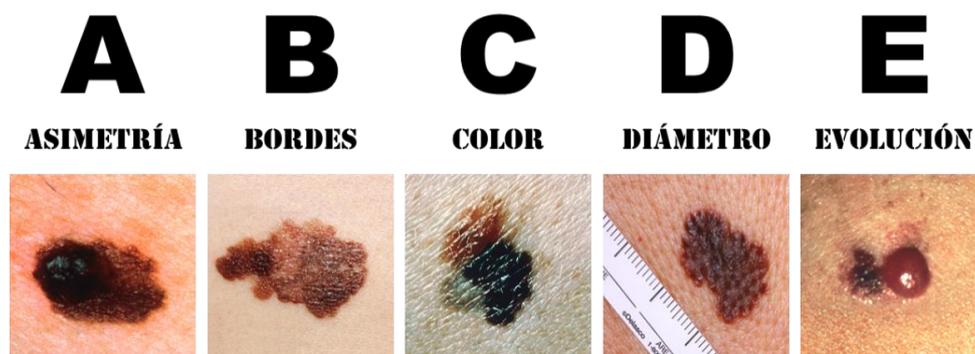


Figura 2.27. Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma cutáneo maligno. Imágenes obtenidas de la colección del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (*National Cancer Institute Visuals Online*).

De acuerdo con la regla ABCDE, es posible diagnosticar correctamente entre el 65% y el 80% de los melanomas. Sin embargo, algunos melanomas no muestran características específicas evidentes, por lo que se hace uso de pruebas adicionales como la dermatoscopia o microscopía de epiluminiscencia, la microscopía confocal *in vivo*, la biopsia de piel, la biopsia del ganglio linfático centinela, la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética o la tomografía por emisión de positrones (Fink & Haenssle, 2017; Marino et al., 2016).

La dermatoscopia o microscopía de epiluminiscencia permite visualizar estructuras microscópicas no visibles a simple vista, mejorando la precisión diagnóstica del melanoma en un rango del 5% al 30%. La microscopía confocal *in vivo* ofrece la

posibilidad de analizar la piel en distintos planos y profundidades sin extirpar tejido, facilitando el diagnóstico no invasivo y el seguimiento de tratamientos.

En el diagnóstico del melanoma, la biopsia de piel, mediante métodos como el raspado, la punción o la biopsia escisional, es clave para obtener un diagnóstico definitivo. Además, se realizan pruebas complementarias, como la biopsia del ganglio linfático centinela, que hace referencia al primer ganglio afectado por el tumor, para determinar si el cáncer se ha diseminado.

En cuanto a las pruebas de imagen, la tomografía axial computarizada (TAC) y la resonancia magnética (MRI) ofrecen imágenes detalladas del interior del cuerpo para detectar anomalías y medir el tamaño de los tumores. La tomografía por emisión de positrones (PET) utiliza una sustancia radiactiva que se acumula en áreas con alto metabolismo, como las células cancerosas, para identificar la presencia de melanoma metastásico en tejidos específicos.

En conjunto, estas técnicas y pruebas son fundamentales para el diagnóstico temprano, la evaluación del estadio y el seguimiento del melanoma, lo que resulta crucial para el pronóstico y tratamiento adecuado del paciente.

2.2.2.7. Clasificación de los estadios del melanoma

Una vez realizado el diagnóstico del melanoma, se determina su estadio o grado de avance (**Tabla 2.1**). La estadificación es esencial para comprender la gravedad de esta enfermedad y predecir tanto el pronóstico del paciente como el tratamiento más adecuado. El término "estadificación" se refiere al proceso de clasificar o categorizar una enfermedad tumoral maligna, como el melanoma, en diferentes estadios según su extensión y propagación en el cuerpo. El sistema de estadificación más utilizado en cáncer es el sistema TNM establecido por el *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que se basa en tres aspectos fundamentales:

1. T: Extensión del tumor primario. Se evalúa el grosor del melanoma (medición de Breslow) y la presencia de ulceración en la piel, lo que puede afectar a la probabilidad de propagación.
2. N: Propagación a los ganglios (nódulos) linfáticos adyacentes. Se busca determinar si el cáncer ha alcanzado los ganglios linfáticos cercanos.
3. M: Propagación a sitios distantes (metástasis). Se analiza si el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

Así pues, se utilizan números romanos (de 0 a IV) para describir los distintos estadios del melanoma, con subdivisiones adicionales mediante letras mayúsculas (A, B, C, etc.):

Estadio 0 (melanoma <i>in situ</i>)	Las células de melanoma se encuentran solamente en la epidermis y no han invadido las capas más profundas de la piel.	
Estadio I (tumor localizado)	IA	El grosor del tumor no excede 1 mm y no presenta ulceración.
	IB	El grosor del tumor no excede 1 mm, pero presenta ulceración o el tumor tiene un grosor entre 1 y 2 mm, sin ulceración.
Estadio II (tumor localizado)	IIA	El tumor tiene un grosor entre 1 y 2 mm y presenta ulceración o el grosor del tumor se encuentra entre 2 y 4 mm, sin ulceración.
	IIB	El tumor tiene un grosor entre 2 y 4 mm y presenta ulceración o el grosor del tumor supera los 4 mm, sin ulceración.
	IIC	El grosor del tumor supera los 4 mm y presenta ulceración.
Estadio III (propagación regional)	IIIA	El melanoma se ha extendido hasta 3 ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, el cual presenta un grosor comprendido entre 1 y 2 mm, con o sin ulceración.
	IIIB	El melanoma se ha extendido hasta 3 ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, el cual presenta un grosor comprendido entre 2 y 4 mm, con o sin ulceración.
	IIIC	El melanoma se ha extendido a más de 4 ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, el cual presenta un grosor superior 4 mm, pero sin ulceración.
	IIID	El melanoma se ha extendido a más de 4 ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, el cual presenta un grosor superior 4 mm y con ulceración.
Estadio IV (melanoma metastásico)	Las células de melanoma se han diseminado más allá del sitio del tumor primario y de los ganglios linfáticos cercanos hacia áreas más distantes del cuerpo. Las áreas más frecuentes de propagación son el pulmón, hígado y cerebro, así como ganglios linfáticos distantes y regiones de la piel alejadas del tumor primario.	

Tabla 2.1. Diferentes estadios del melanoma.

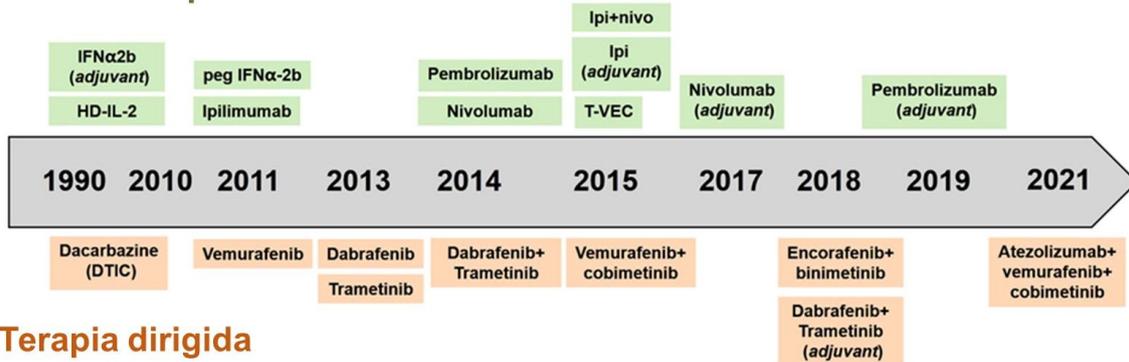
2.2.2.8. Tratamiento del melanoma

El tratamiento del melanoma ha experimentado una evolución significativa a lo largo del tiempo. Inicialmente, hasta la década de 1960, se centraba en la cirugía, con la extirpación quirúrgica del tumor como principal enfoque. En las décadas de 1960 y 1970, se introdujo la quimioterapia como tratamiento sistémico, mientras que las décadas de 1980 y 1990 vieron la llegada de la radioterapia y las primeras inmunoterapias con interleucina-2 (IL-2) e interferón α -2b (IF- α 2b). Posteriormente, en los años 2000, surgieron terapias dirigidas centradas en mutaciones específicas del melanoma, como los inhibidores de BRAF y MEK. Sin embargo, fue en la década de 2010, donde se presenció un avance significativo con la inmunoterapia, incluyendo inhibidores de puntos de control inmunitario y combinaciones con terapias dirigidas, mejorando la supervivencia en casos avanzados (Patton et al., 2021). Actualmente, la investigación continúa, explorando nuevas combinaciones de terapias dirigidas e inmunoterapia, así como terapias genéticas y terapias con virus oncolíticos, prometiendo un futuro más específico y efectivo en el tratamiento del melanoma gracias a una mayor comprensión de su biología y la medicina personalizada.

Antes de 2010, la situación en cuanto al tratamiento del melanoma era bastante desalentadora. Si bien es cierto que la cirugía era, y sigue siendo, la estrategia más efectiva para extirpar el tumor en sus etapas iniciales, las opciones para combatir el melanoma metastásico se limitaban principalmente a la aplicación de las primeras inmunoterapias con citoquinas o el uso de quimioterapia, como la dacarbazina (Guo et al., 2021). Los tratamientos con altas dosis de IL-2 o con IF- α 2b mostraban propiedades inmunomoduladoras y antitumorales en el melanoma, pero estas terapias solo beneficiaban a un reducido número de pacientes o resultaban en una toxicidad significativa que requería hospitalización (Domingues et al., 2018). Por otro lado, la dacarbazina y otros sistemas de quimioterapia solo tenían una eficacia limitada en el tratamiento del melanoma, con tasas de respuesta de aproximadamente un 20%. Además, surgió la radioterapia como una opción terapéutica alternativa que involucra el uso de rayos X o gamma. Aunque inicialmente se aplicaba con el propósito de erradicar células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores, posteriormente se comprobó que el mayor beneficio se obtiene cuando la radioterapia se emplea en conjunto con inmunoterapias para mejorar su eficacia, fortaleciendo tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa contra el cáncer (Kim et al., 2020).

A partir de 2011, dos tipos nuevos de fármacos comenzaron a cambiar el panorama de tratamientos para el melanoma metastásico (Guo et al., 2021). Uno fue un grupo de terapias dirigidas llamadas inhibidores de BRAF e inhibidores de MEK y el otro fue un tipo de inmunoterapia llamada inhibidores de puntos de control inmunitario. Además, también se aprobó el uso de la inmunoterapia oncolítica con talimogene laherparepvec (T-VEC) (**Figura 2.28**).

Inmunoterapia



Terapia dirigida

Figura 2.28. Secuencia temporal de las terapias aprobadas por la FDA para el melanoma metastásico. HD: dosis altas, Ipi: Ipilimumab, T-VEC: talimogene laherparepvec. Imagen traducida de Guo et al., 2021.

Aproximadamente el 70% de los individuos con melanoma cutáneo presentan mutaciones en genes que participan en rutas de señalización clave, principalmente en *BRAF*. Estas alteraciones genéticas pueden relacionarse con el crecimiento de las células de melanoma y un comportamiento maligno (Flaherty, 2012). En la estrategia de la terapia dirigida, se emplean moléculas pequeñas o anticuerpos que influyen en estas proteínas mutadas, que desempeñan un papel fundamental en el avance de la enfermedad (**Figura 2.29**).

En los últimos años, se han desarrollado enfoques moleculares para combatir el melanoma que presenta mutaciones en *BRAF*, una quinasa clave en la ruta de MAPK. La agencia de administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA, *Food and Drug Administration*) aprobó dos inhibidores selectivos de la proteína con la mutación *BRAF*^{V600E}, el vemurafenib en 2011 y el dabrafenib en 2013, para tratar melanomas irreseccables (no viables quirúrgicamente) o metastásicos con esta mutación. Comparado con la quimioterapia, ambos fármacos mejoraron significativamente las tasas de respuesta clínica, la supervivencia sin progresión y la supervivencia global en pacientes con melanoma metastásico (Ballantyne & Garnock-Jones, 2013; Chapman et al., 2011). A pesar de los notables beneficios clínicos de las

terapias que se dirigen a bloquear BRAF mutante, la resistencia a estos tratamientos se ha convertido en un desafío. Sin embargo, las terapias combinadas en pacientes con melanoma parecen ser una estrategia adecuada para superar estos mecanismos de resistencia (Rizos et al., 2014). En este sentido, el dicloroacetato, que modifica el metabolismo de las células cancerosas y las hace más susceptibles a la apoptosis, ha demostrado ser efectivo incluso en células de melanoma resistentes a vemurafenib (Pópulo et al., 2015).

Además, dirigirse a los efectores de señalización aguas abajo de los oncogenes impulsados por *BRAF* representa una estrategia efectiva para vencer la resistencia a los inhibidores de BRAF (Flaherty, Robert, et al., 2012). En particular, el bloqueo de MEK, que se encuentra aguas abajo de BRAF, presenta diferencias significativas en comparación con los inhibidores de BRAF, ya que los inhibidores de MEK han demostrado actividad positiva en melanomas que portan mutaciones *NRAS*. En 2013, la FDA aprobó el trametinib, un inhibidor farmacológico de MEK1/2 con propiedades antitumorales para el tratamiento de melanomas que portan mutaciones *BRAF* y que no son candidatos para cirugía o presentan metástasis (Livingstone et al., 2014). La inhibición de MEK1/2 conlleva la supresión de la señalización celular mediada por factores de crecimiento y una reducción en la proliferación de células tumorales. Otra estrategia exitosa es la terapia combinada de trametinib y dabrafenib, aprobada en 2014 por la FDA (Flaherty, Infante, et al., 2012). En 2015, se obtuvo la aprobación de la combinación de vemurafenib y cobimetinib, otro inhibidor selectivo de MEK (Larkin et al., 2014). Este enfoque ha demostrado mejoras significativas en la supervivencia sin progresión de los pacientes con melanoma. Asimismo, varios ensayos clínicos están en curso para evaluar la combinación de cobimetinib y vemurafenib, así como su uso en combinación con quimioterapia, inmunoterapias y otras terapias dirigidas (Ribas et al., 2020). Además, aguas debajo de MEK, se han identificado otros inhibidores, como el inhibidor selectivo de ERK1/2 llamado SCH772984, que puede erradicar las células tumorales que presentan mutaciones *BRAF*, *NRAS* o *KRAS* en una concentración nanomolar (Morris et al., 2013). Aunque los inhibidores de BRAF y MEK son los tipos de terapia dirigida más conocidos, se han estudiado dianas moleculares alternativas como son los inhibidores de c-KIT, de VEGF, de la ruta PI3K-AKT-mTOR o de las quinasas dependiente de ciclinas (**Figura 2.29**). En el melanoma, las mutaciones en el gen *KIT* pueden activar señalización celular anormal. El inhibidor de c-KIT, imatinib, ha mostrado cierta eficacia en pacientes con melanoma que presentan estas mutaciones, aunque la duración de la respuesta es limitada (Hodi et al., 2013). Otros inhibidores multiquinasa, como sunitinib, dasatinib y nilotinib, pueden tener actividad en pacientes con melanoma

que contienen mutaciones en *KIT* (Livingstone et al., 2014). Además, los melanomas expresan niveles elevados de VEGF, que promueve la formación de vasos sanguíneos en el tumor. Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal anti-VEGF, ha demostrado beneficios en ensayos clínicos, pero aún no es una terapia aprobada (Kim et al., 1993). La ruta de señalización PI3K-AKT-mTOR también desempeña un papel importante en el melanoma, y se están evaluando inhibidores de esta vía en combinación con otros tratamientos (Pópulo et al., 2012). Además, dado que, en los melanomas familiares un 2% se asocian con mutaciones en CDK4, existe una nueva generación de inhibidores selectivos de CDK4/6, incluidos ribociclib, abemaciclib y palbociclib, que ha permitido atacar a los tumores con más eficacia y menos efectos adversos (O'Leary et al., 2016).

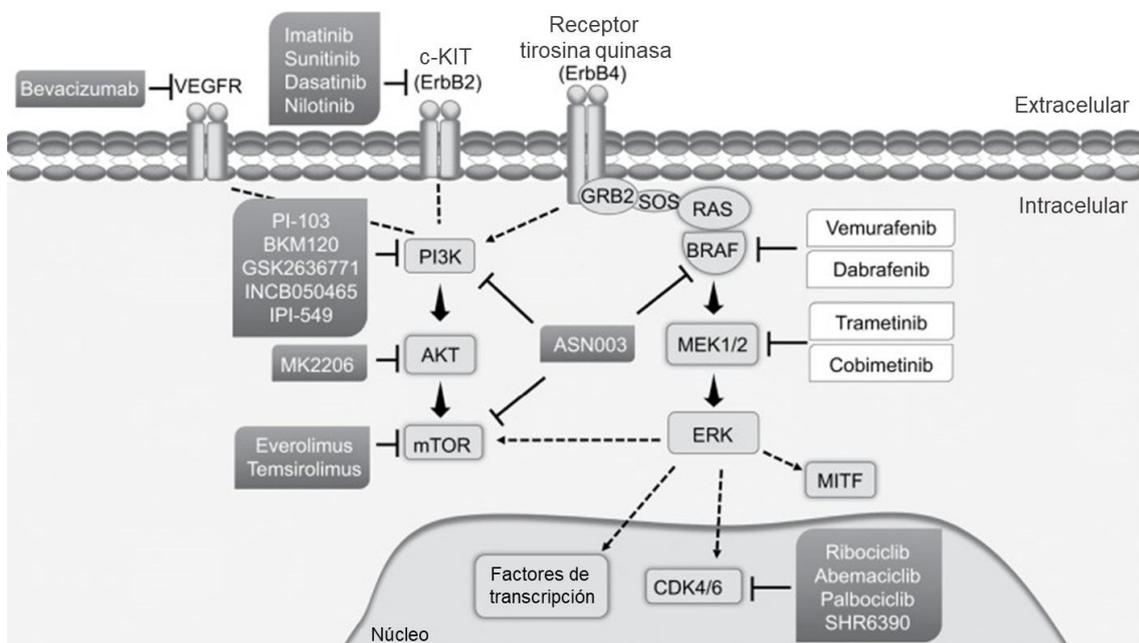


Figura 2.29. Terapias dirigidas aprobadas por la FDA (en blanco: vemurafenib, dabrafenib, trametinib y cobimetinib) o en ensayos (en gris oscuro: imatinib, sunitinib, dasatinib, nilotinib, bevacizumab, PI-103, BKM120, GSK2636771, INCB050465, IPI-549, MK2206, everolimus, temsirolimus, ribociclib, abemaciclib, palbociclib, SHR6390 y ASN003) para el tratamiento del melanoma cutáneo. AKT: proteína quinasa B, BRAF: protooncogén B-Raf, CDK: quinasa dependiente de ciclina, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento, MEK: quinasa activada por mitógenos que activa a ERK, MTF: factor de transcripción asociado a microftalmia, mTOR: proteína diana de la rapamicina en mamíferos, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial. Imagen traducida de Domingues et al., 2018.

En cuanto a la inmunoterapia, en las últimas décadas, la estrategia de bloquear los puntos de control inmunitario ha demostrado ser prometedora en el tratamiento del cáncer, al reactivar la respuesta inmunitaria contra las células tumorales (Soularue et al.,

2018). La activación de las células T requiere dos señales: el reconocimiento del antígeno tumoral y una señal coestimuladora. Sin embargo, existen señales inhibitoras, como CTLA-4, PD-1 y PD-L1, conocidas como "puntos de control inmunitario", que pueden frenar la respuesta inmunitaria (**Figura 2.30**).

Ipilimumab, aprobado por la FDA en 2011 para el tratamiento de melanomas avanzados, es un anticuerpo que se dirige contra el receptor CTLA-4. Este receptor actúa como un inhibidor clave en el control del sistema inmunitario que restringe la activación de las células T y promueve la tolerancia inmune (**Figura 2.30**) (Brunet et al., 1987). El bloqueo de CTLA-4 conduce a una mayor producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células T y un incremento en la expansión e infiltración de células T en los tumores que responden al tratamiento.

El receptor PD-1 se une a sus ligandos PD-L1 y PD-L2, actuando como una molécula que inhibe la función de las células T y suprime su activación (**Figura 2.30**). Nivolumab es un anticuerpo monoclonal de alta afinidad contra PD-1 que bloquea la interacción entre el receptor PD-1 y sus ligandos. Fue aprobado por la FDA en 2014 para el tratamiento de melanoma metastásico y ha demostrado una eficacia superior en comparación con monoterapias como ipilimumab o quimioterapia (Specenier, 2016). Pembrolizumab, otro anticuerpo anti-PD-1, recibió la aprobación de la FDA en 2015 para el tratamiento de melanomas avanzados. Ofrece una supervivencia global mejorada en pacientes con melanoma avanzado en comparación con ipilimumab, con una toxicidad menor (Robert et al., 2015). Además, se están llevando a cabo múltiples ensayos clínicos que investigan el uso de nivolumab y pembrolizumab en monoterapia o en combinación con otras terapias como quimioterapia, radioterapia, inmunoterapias adicionales y terapias dirigidas. También se están evaluando otras moléculas anti-PD-1 y anti-PD-L1 en ensayos clínicos de fase I/II, en diversas combinaciones y para diferentes tipos de cáncer, como melanoma y otros (Domingues et al., 2018).

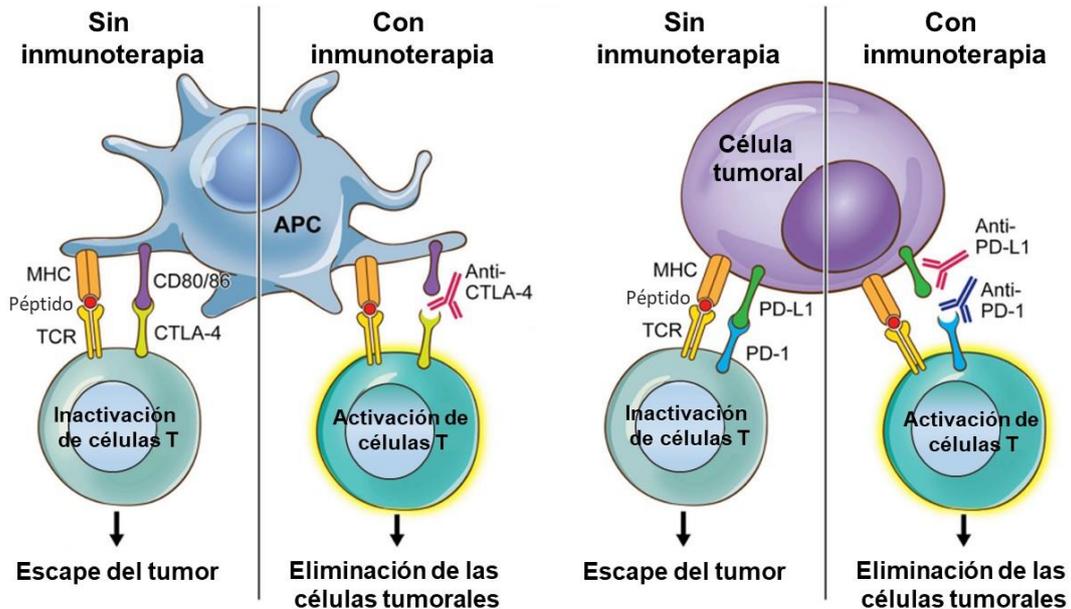


Figura 2.30. Papel de CTLA-4 y PD-1 en la regulación del sistema inmunitario. APC: célula presentadora de antígenos, MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, TCR: receptor de células T. Imagen traducida de Soularue et al., 2018.

No obstante, a pesar de los avances significativos en el ámbito de las terapias dirigidas e inmunoterapias para combatir el cáncer, estas modalidades terapéuticas presentan limitaciones importantes como la capacidad de las células cancerosas para desarrollar resistencia con el tiempo.

Otra modalidad de inmunoterapia antitumoral es mediante el uso de virus oncolíticos, una terapia que puede ocasionar la regresión del tumor al destruir de manera específica las células cancerosas, inducir la muerte celular inmunogénica y estimular una respuesta inmunitaria sistémica contra el cáncer (Kaufman et al., 2015). Hasta hace poco, se habían observado beneficios clínicos mediante la administración directa de virus oncolíticos dentro del tumor. En 2015, la FDA aprobó el primer tratamiento de este tipo, talimogene laherparepvec (T-VEC), para tratar localmente a pacientes con melanoma recurrente que no eran candidatos para cirugía (Pol et al., 2016). T-VEC es una versión genéticamente modificada del virus del herpes simple tipo 1 (HSV-1). Sus modificaciones genéticas incluyen la eliminación de genes específicos que mejoran su capacidad para atacar el cáncer. Estos cambios permiten que el virus se replique selectivamente en células tumorales, disminuyendo su patogenicidad. Además, T-VEC incorpora genes que estimulan una respuesta inmunológica sistémica contra el virus y las células cancerosas (Bommareddy et al., 2017). Esto ha generado un gran interés en el desarrollo de otros virus oncolíticos como coxsackievirus A21 (V937), con el fin de permitir una opción alternativa de tratamiento frente al melanoma (Lutzky et al., 2023).

Recientemente, se ha desarrollado la terapia de transferencia de células T como un nuevo enfoque terapéutico para los tumores sólidos, incluidos los melanomas (Zhang & Xu, 2017). Se divide en dos categorías principales: la terapia con linfocitos infiltrantes tumorales (TIL, *tumor-infiltrating lymphocytes*) y la terapia de células T que expresan el receptor antígeno quimérico (CAR, *chimeric antigen receptor*). Ambas estrategias implican obtener células inmunitarias del paciente, cultivarlas en el laboratorio y luego reintroducirlas en el cuerpo a través de una infusión intravenosa. El proceso de cultivo de estas células puede durar de 2 a 8 semanas y generalmente se combina con quimioterapia y, en ocasiones, radioterapia para reducir otras células inmunitarias y mejorar la eficacia de las células T cultivadas. En la terapia con células TIL, se extraen linfocitos T del tumor y se seleccionan aquellos que tienen una mejor respuesta contra las células cancerosas, luego se multiplican en el laboratorio antes de reintroducirlas en el paciente. En la terapia de células T con CAR, las células T se modifican en el laboratorio para producir receptores de antígeno quimérico que mejoran su capacidad para reconocer y atacar a las células cancerosas (Domingues et al., 2018). Estas estrategias han mostrado resultados prometedores en estudios preclínicos y se encuentran actualmente en ensayos clínicos con pacientes de melanoma (Almåsbaek et al., 2016; Jackson et al., 2016; Merhavi-Shoham et al., 2017).

2.2.2.9. Importancia del microambiente tumoral, heterogeneidad y plasticidad celular en la resistencia a terapias en melanoma

A pesar de la evolución en el tratamiento del melanoma, las terapias disponibles en la actualidad no ofrecen una cura para el 80% de los pacientes con melanoma metastásico. Un gran número de pacientes presenta resistencia innata a estas terapias (resistencia primaria), mientras que, en otros, el melanoma puede reaparecer y desarrollar resistencia después de una respuesta inicial (resistencia adquirida).

La enorme diversidad presente tanto en las células cancerosas como en las células que constituyen el microentorno tumoral desencadena la progresión de la enfermedad y contribuye a la resistencia a las terapias (Marusyk et al., 2020). En este sentido, la agresividad del melanoma se debe en gran parte a su marcada heterogeneidad intratumoral. Este término se refiere a la presencia de diversas subpoblaciones de células cancerosas en un tumor, cada una con patrones genéticos distintos y fenotipos diversos. Los tumores con esta composición heterogénea pueden adaptarse rápidamente a cambios en su entorno, lo que resulta en una mayor resistencia a los tratamientos (Ahmed & Haass, 2018). En general, la heterogeneidad se puede clasificar en tres tipos: heterogeneidad entre pacientes, intertumoral e intratumoral. Así, nos

podemos referir por tanto a las diferencias en tumores de pacientes diversos, entre distintas lesiones del mismo paciente y diferencias en poblaciones celulares presentes dentro de un tumor determinado, respectivamente (Ng et al., 2022).

También es importante considerar el concepto de plasticidad tumoral, que sugiere que la heterogeneidad no es un proceso unidireccional, sino más bien un proceso dinámico que permite a las células cambiar entre diferentes estados fenotípicos en lugar de seguir un patrón jerárquico. Esta diversidad intratumoral contribuye a la progresión del tumor al afectar sus propiedades migratorias e invasivas (Hoek & Goding, 2010). Los genes que definen un estado de invasión difieren significativamente de aquellos que definen un estado de proliferación, y estos estados pueden verse influenciados por diferentes tratamientos (Verfaillie et al., 2015).

Además, el microambiente tumoral representa un ecosistema complejo compuesto por células cancerosas y no cancerosas. Los tipos de células no cancerosas incluyen células epiteliales y endoteliales, fibroblastos y células del sistema inmunitario como células dendríticas, macrófagos y células T o B. Al igual que las células cancerosas, este microambiente también sufre cambios a lo largo de la evolución del tumor, lo que promueve aún más el crecimiento, la invasión y la resistencia a la terapia de las células cancerosas (Somasundaram et al., 2016).

Aunque la variabilidad fenotípica y la plasticidad en líneas celulares de melanoma se describieron hace aproximadamente cuatro décadas (Bennett, 1983; Fidler et al., 1981), la caracterización molecular de estados fenotípicos específicos se mejoró significativamente con la identificación del gen que codifica el factor de transcripción asociado a la microftalmia, MITF (Hodgkinson et al., 1993; Hughes et al., 1994), que ha permitido definir estados fenotípicos concretos influenciados por señales del microambiente.

El modelo de reóstato de MITF ha demostrado ser útil para explicar cómo las células pueden alterar sus características fenotípicas de manera reversible *in vivo*, pasando entre estados diferenciados, proliferativos e invasivos en respuesta a señales del microambiente que influyen en la actividad de MITF (**Figura 2.31**). Lo más significativo es que, a diferencia de muchos otros cánceres, se han identificado marcadores biológicos claramente definidos para los distintos estados fenotípicos de las células de melanoma. Estos marcadores han proporcionado información clave sobre los mecanismos moleculares que impulsan estos cambios fenotípicos inducidos por el microambiente, así como su relación con la propagación de metástasis y la resistencia a la terapia (Rambow et al., 2019). En general, se distinguen dos grandes poblaciones

celulares en función de la expresión de MITF. Las células que presentan niveles bajos de MITF se asocian con una mayor resistencia a fármacos, mientras que su presencia es necesaria para respuestas sólidas a los medicamentos. Tanto en la resistencia primaria como en la adquirida, los niveles de MITF se correlacionan inversamente con la expresión de varios receptores tirosina quinasa, como AXL, que está implicado en los mecanismos de resistencia a los medicamentos por parte de las células cancerosas (Müller et al., 2014). Así pues, se ha identificado el fenotipo MITF^{alto} / AXL^{bajo} para células proliferativas, poco invasivas y sensibles a drogas y el fenotipo MITF^{bajo} / AXL^{alto} para células invasivas y resistentes a drogas. En este sentido, y teniendo en cuenta el modelo de reóstato de MITF, los estados celulares con mayor capacidad para generar tolerancia a drogas son los estados desdiferenciados, de estrés (por falta de nutrientes, oxígeno, etc.) y similares a las células madre de la cresta neural, así como los estados hiperdiferenciados no proliferativos (**Figura 2.31**).

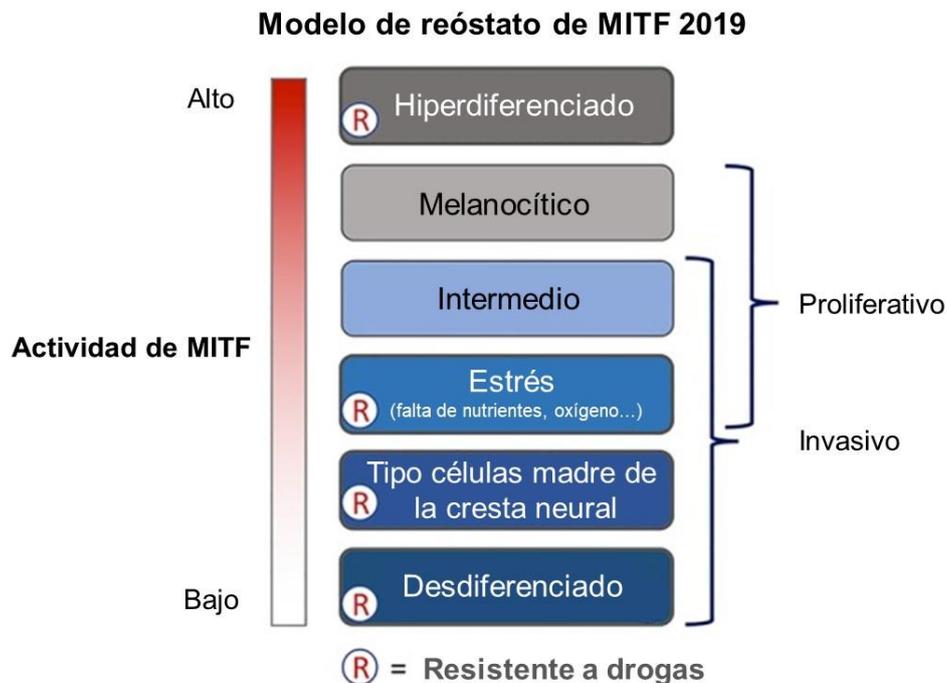


Figura 2.31. Modelo de reóstato según la expresión de MITF en melanoma. Imagen traducida de Rambow et al., 2019.

En definitiva, una mejor comprensión de esta compleja red y su implicación en la diversidad dentro del tumor, la adquisición de resistencia a los fármacos y, en última instancia, la ineficacia del tratamiento puede abrir la puerta a nuevas estrategias terapéuticas contra el melanoma resistente.

2.2.2.10. Evasión del sistema inmunitario en melanoma

El sistema inmunitario se define como el conjunto de estructuras, células y procesos biológicos que actúan de forma coordinada para proteger al organismo contra las enfermedades y las infecciones causadas por microorganismos patógenos, como bacterias, virus, hongos y otros agentes nocivos. Su función principal es identificar y eliminar estas amenazas, así como también reconocer y eliminar células anormales o dañadas dentro del cuerpo. Existen dos tipos principales de sistema inmunitario: innato y adaptativo (Vivier & Malissen, 2005).

El sistema inmunitario innato actúa como una primera línea de defensa rápida y genérica contra las amenazas. No es específico para un patógeno en particular y está presente desde el nacimiento. Incluye barreras físicas como la piel y las mucosas, así como células especializadas como neutrófilos, monocitos, macrófagos, células dendríticas y células NK (Zhang & Zhang, 2020). Los neutrófilos, monocitos y macrófagos son capaces de eliminar células tumorales, así como desencadenar reacciones tanto proinflamatorias como inmunosupresoras en el microambiente tumoral. Las células dendríticas son potentes células presentadoras de antígenos que pueden localizar elementos extraños en el cuerpo, fagocitarlos y luego "presentar" los antígenos de estos elementos no deseados en su superficie. En concreto, las células dendríticas se dirigen a regiones donde se encuentran los linfocitos, como los ganglios linfáticos y el bazo, y los activan para iniciar una respuesta inmunitaria específica contra estos antígenos (Mitchell et al., 2018). Finalmente, las células NK desempeñan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria innata (Vivier et al., 2011). Estas células tienen la capacidad de atacar a las células cancerosas sin requerir una especificidad particular de antígenos, lo que complementa la acción de las células T citotóxicas que sí dependen de la especificidad del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células NK eliminan directamente las células tumorales utilizando gránulos citotóxicos y también colaboran con otras células inmunitarias al liberar citoquinas proinflamatorias (Paul & Lal, 2017).

El sistema inmunitario adaptativo o adquirido se desarrolla a lo largo del tiempo en respuesta a las infecciones y es altamente específico para determinados patógenos. Las células clave en este sistema son los linfocitos T y B. Los linfocitos T tienen un papel clave en la investigación de la inmunología tumoral debido a sus diversas funciones, como la eliminación directa de células infectadas y la regulación de la respuesta inmunitaria (Coullie et al., 2014). Su activación se inicia cuando los receptores de células T (TCR, *T-cell receptor*) interactúan con fragmentos de antígenos tumorales presentados por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major*

histocompatibility complex). Los TCR se producen a través de una serie de reordenamientos genéticos que generan una amplia gama de variantes, otorgando a las células T diversidad y especificidad. Entre los principales tipos de células T, además de las células T citotóxicas (T CD8+), se incluyen las células T auxiliares (CD4+) y las células T reguladoras. En cambio, los linfocitos B producen anticuerpos que se unen a patógenos específicos y los neutralizan. Además, ayudan a mantener la estructura de órganos linfoides y contribuyen a la formación de estructuras linfoides terciarias (TLS, *tertiary lymphoid structures*) en sitios de inflamación crónica y tumores, lo que favorece el reclutamiento y la activación local de células B y T y, por lo tanto, contribuye a la inmunidad a largo plazo (Sautès-Fridman et al., 2019).

La importancia del sistema inmunitario en la eliminación de las células cancerosas se ha reconocido desde hace tiempo, con casos de regresión espontánea del melanoma (Papac, 1996). Inicialmente, Thomas y Burnet introdujeron el término de "inmunovigilancia", demostrando que el sistema inmunitario elimina las células malignas al reconocer antígenos asociados a tumores (Parish, 2003). Sin embargo, se ha reconocido que la relación entre el sistema inmunitario y el cáncer es más compleja de lo que se pensaba inicialmente (Dunn et al., 2002, 2004). Además de la inmunovigilancia, el sistema inmunitario también puede controlar el cáncer durante largos períodos de tiempo mediante un proceso llamado equilibrio (Koebel et al., 2007). Esto ha llevado al desarrollo de la hipótesis de la inmunoección del cáncer, que abarca las diversas funciones potenciales del sistema inmunitario en la protección y la modulación del crecimiento tumoral durante todo el desarrollo del cáncer (Dunn et al., 2004). La inmunoección del cáncer consta de tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 2.32**). En la fase de eliminación, que representa el concepto clásico de inmunovigilancia, los sistemas inmunitarios innato y adaptativo cooperan entre sí para identificar y destruir células cancerosas antes de que sean evidentes clínicamente. Sin embargo, algunas células malignas pueden no ser completamente eliminadas y, en su lugar, entran en una fase de equilibrio, donde el sistema inmunitario controla su crecimiento. Durante esta fase, algunas células cancerosas sobreviven a la presión selectiva del sistema inmunitario, pero su proliferación se ve estrictamente limitada. A pesar de que puede durar años, este periodo de latencia tumoral puede interrumpirse repentinamente, llevando a la progresión de las células hacia la fase de escape o evasión. En esta etapa, las células tumorales editadas con menor inmunogenicidad comienzan a crecer sin restricciones inmunológicas, creando un entorno tumoral que suprime la respuesta inmunitaria (Borroni & Grizzi, 2021).

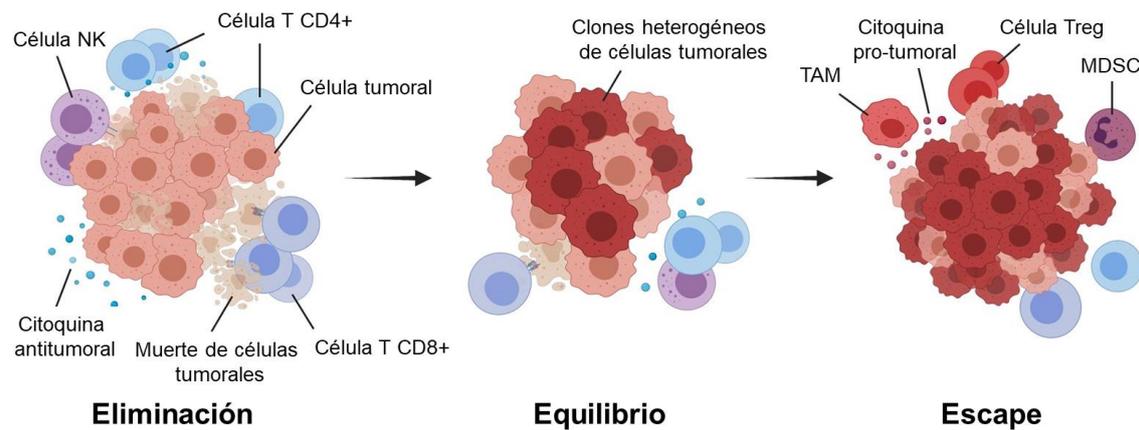


Figura 2.32. Inmunomodulación a lo largo de la formación y progresión del tumor. MDSC: células supresoras derivadas de células mieloides, TAM: macrófagos asociados a tumores. Imagen traducida de Zhu & Yu, 2022.

A pesar de que el melanoma es altamente inmunogénico y podría provocar una respuesta inmune antitumoral debido a su alta carga mutacional, también es capaz de evadir la respuesta del sistema inmunitario. Uno de los mecanismos involucrados en este escape inmunitario se produce a través del receptor activador NKG2D, expresado en células NK (Duan et al., 2019). La activación de estos receptores desencadena la citotoxicidad mediada por células NK y proporciona una señal coestimuladora para las células T CD8+ y las células T $\gamma\delta$ (S. Bauer et al., 1999).

El receptor activador NKG2D es una proteína transmembrana de tipo II similar a la lectina de tipo C expresada como un homodímero en la superficie de todas las células NK murinas y humanas (Paul & Lal, 2017). La activación de este receptor provoca su unión con la proteína DAP10 o DAP12 (en ratón), lo que permite transmitir señales intracelulares a través de la PI3K y GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) para activar la transcripción de genes diana asociados con el mantenimiento de las células efectoras, incluidos aquellos que regulan la proliferación, la citotoxicidad y la liberación de citoquinas, perforinas y granzimas (**Figura 2.33**). De esta manera, se favorece la eliminación de las células tumorales.

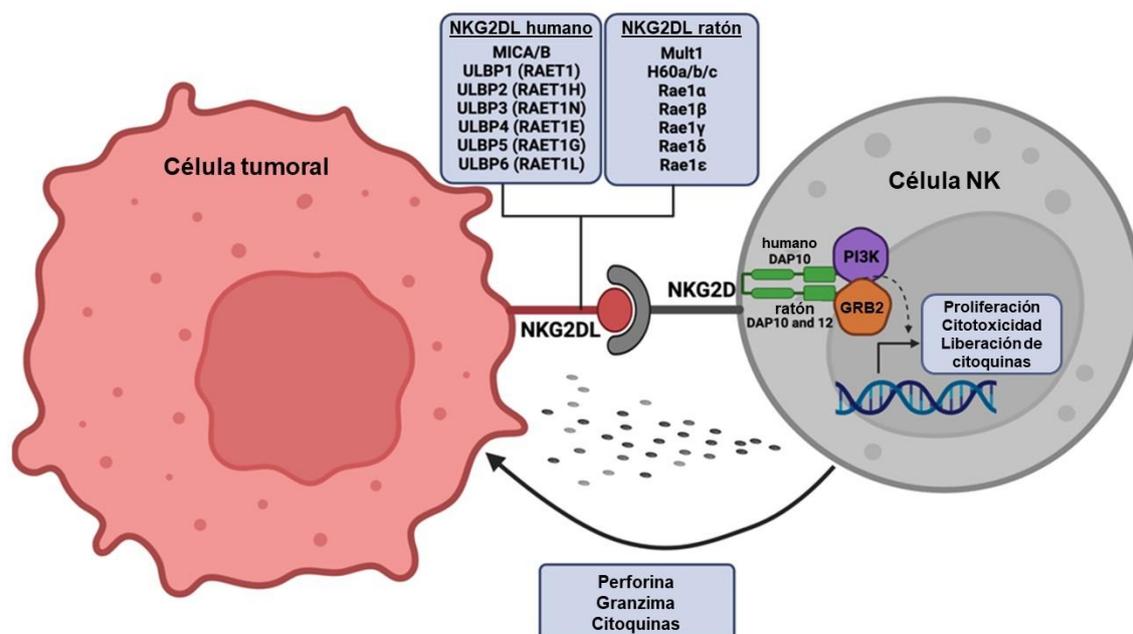


Figura 2.33. Función del receptor NKG2D en células NK. GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento, NKG2DL: ligando del receptor NKG2D, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa. Imagen traducida de Jones et al., 2022.

El receptor NKG2D reconoce una amplia gama de ligandos. Sus ligandos son a menudo expresados como respuesta a la transformación maligna y se han convertido en un enfoque clave de investigación en inmunoterapia contra el cáncer (**Figura 2.33**). En ratones, NKG2D se une a las proteínas de la familia Rae-1 α - ϵ , al antígeno menor de histocompatibilidad H60 y al transcrito similar a la proteína de unión a UL16 de ratón (MULT-1) (Dunn et al., 2004). En humanos, los ligandos de NKG2D incluyen las moléculas relacionadas con el MHC-I, MICA (*MHC class I polypeptide-related sequence A*) y MICB (*MHC class I polypeptide-related sequence B*), así como seis tipos de proteínas de unión a UL16 1-6 (ULBP1-6). MICA y MICB, abreviados como MICA/B, son los ligandos más estudiados debido a que las células malignas los regulan negativamente mediante mecanismos moleculares desconocidos que representan nuevos objetivos terapéuticos (Xing & Ferrari de Andrade, 2020). Se ha visto en muchos cánceres humanos, incluyendo melanoma, que la actividad de MICA/B se reduce mediante un proceso de corte proteolítico, lo que facilita la evasión del sistema inmunitario. En esta Tesis Doctoral, nos hemos centrado en la eliminación de MICA/B, con el objetivo de que puedan desarrollarse nuevas estrategias de inmunoterapia en el tratamiento del melanoma.

Los ligandos MICA/B para NKG2D son proteínas de membrana con dominios extracelulares similares al MHC, pero a diferencia de las moléculas MHC clásicas, no se asocian con la $\beta 2$ microglobulina ni presentan antígenos (Groh et al., 1996). Los ectodominios de MICA/B constan de tres dominios tipo Ig tipo C denominados dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ son los que interactúan con la proteína NKG2D y están ubicados más lejos de la membrana celular, mientras que el dominio $\alpha 3$, más cercano a la membrana, no interactúa con NKG2D (Li et al., 2001). La escisión proteolítica de MICA/B comienza en el dominio $\alpha 3$, donde una proteína disulfuro isomerasa, llamada ERp5, rompe un enlace disulfuro específico entre los aminoácidos 202 y 259, lo que probablemente despliega el dominio $\alpha 3$ y expone el sitio de escisión proteolítica (Kaiser et al., 2007). Esta escisión es un proceso de varios pasos que involucra a varias metaloproteasas, incluyendo MMP14, ADAM10 y ADAM17, y resulta en la liberación de la porción extracelular completa de MICA/B, incluyendo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ que son esenciales para la unión a NKG2D (Liu et al., 2010; Waldhauer et al., 2008).

Varios estudios han demostrado que altos niveles de ADAM10 en células de melanoma se correlacionan con una menor respuesta inmunitaria y una mayor progresión del tumor (Donizy et al., 2015; Gangemi et al., 2014; Lee et al., 2010). ADAM10 es una enzima anclada a la membrana que está involucrada en diversos eventos biológicos, como la escisión de proteínas de membrana y la proteólisis. Pertenece a la superfamilia ADAM (*a desintegrin and metalloproteasas*), que contiene 21 miembros en humanos, 13 de los cuales codifican un dominio proteolíticamente activo y comparten una estructura común (**Figura 2.34**). Las proteínas ADAM comparten una estructura multidominio común que incluye un dominio extracelular N-terminal con un prodominio tipo chaperona con dos sitios de reconocimiento convertasa, un dominio catalítico de metaloproteinasa dependiente de Zn^{2+} , un dominio de desintegrina, un dominio rico en cisteína que tiene una región hipervariable (HVR), repeticiones de un dominio similar a EGF (*epidermal growth factor*), un dominio transmembrana y un dominio citoplásmico de unión a SH3 C-terminal (Lambrecht et al., 2018). En el caso de ADAM10 y ADAM17, no tienen el dominio similar a EGF. ADAMDEC1 (similar a ADAM y decisina 1) es una metaloproteinasa inusual que, a diferencia de las ADAM clásicas, se secreta en lugar de estar anclada a la membrana. Las proteínas ADAMTS son una familia de proteinasas que contienen varias repeticiones de trombospondina en su estructura.

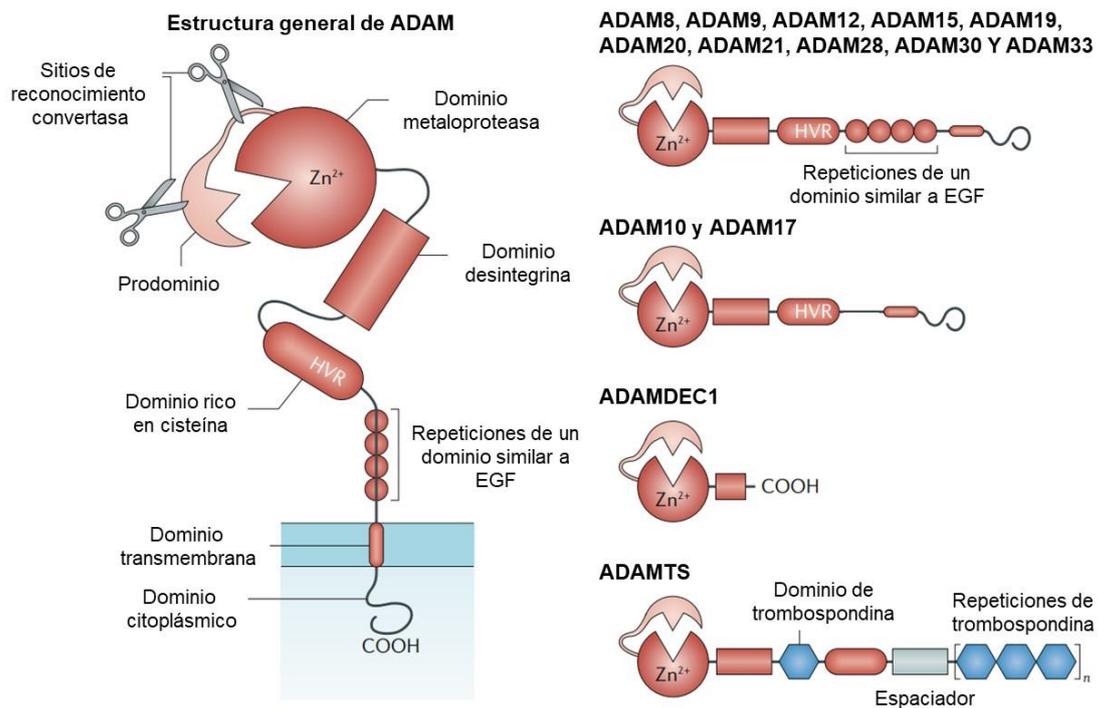


Figura 2.34. Estructura de las proteínas ADAM y ADAMTS humanas que tienen actividad proteolítica. EGF: factor de crecimiento epidérmico, HVR: región hipervariable. Imagen traducida de Lambrecht et al., 2018.

Recientemente, estudios con células de melanoma revelaron que los anticuerpos dirigidos específicamente al dominio $\alpha 3$ de MICA/B suprimieron de manera significativa su corte proteolítico, lo que se tradujo en un notable incremento de la actividad citotóxica por parte de las células NK (Ferrari de Andrade et al., 2018). Por tanto, el bloqueo de la eliminación proteolítica de MICA/B en las células tumorales provocó que las células NK pudieran detectarlas y eliminarlas.

2.3. CÁNCER DE PÁNCREAS

El cáncer de páncreas es una enfermedad maligna que se origina en el tejido pancreático, un órgano vital ubicado en la parte superior del abdomen. Se caracteriza por un crecimiento anormal y descontrolado de las células pancreáticas, que puede dar lugar a la formación de tumores. Este tipo de cáncer es conocido por su agresividad y su tendencia a propagarse rápidamente a otros órganos, lo que dificulta su detección temprana y su tratamiento efectivo. A menudo, el cáncer de páncreas no causa síntomas evidentes en las etapas iniciales, lo que contribuye a su diagnóstico en etapas demasiado avanzadas, cuando las opciones terapéuticas son limitadas. Aunque la investigación médica ha avanzado en la comprensión de los factores de riesgo y las posibles causas subyacentes del cáncer de páncreas, sigue siendo una enfermedad desafiante con una tasa de supervivencia global relativamente baja.

Se distinguen dos tipos de cáncer de páncreas, en función del tipo de célula donde se origina, siendo los cánceres exocrinos el tipo de cáncer de páncreas más común. Entre estos cánceres, destaca el adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) con un 95%, aunque existen otros tipos menos frecuentes de cáncer de páncreas exocrino como los carcinomas adenoescamosos, carcinomas de células escamosas, carcinomas de células en anillo de sello y carcinomas no diferenciados (Luchini et al., 2020). El resto de las neoplasias pancreáticas se originan en las células endocrinas, que representan alrededor del 7% de todos los casos de cáncer de páncreas, donde destacan los tumores neuroendocrinos pancreáticos como el insulinoma, glucagonoma y gastrinoma (Mpillá et al., 2020).

2.3.1. Células pancreáticas y cáncer de páncreas

El cáncer de páncreas es un tipo de cáncer que se inicia por el crecimiento descontrolado de las células del páncreas. El páncreas es un órgano dual con funciones tanto endocrinas como exocrinas, ya que participa en la producción de hormonas y en la secreción de enzimas digestivas. Estas dos funciones se realizan a través de diferentes tipos de células presentes en el páncreas: células endocrinas y células exocrinas (**Figura 2.35**).

Células Endocrinas

Las células endocrinas representan una pequeña proporción del páncreas y se agrupan en estructuras llamadas islotes de Langerhans, que están dispersos por todo el tejido pancreático. Estas células son responsables de producir y liberar hormonas

directamente en el torrente sanguíneo, lo que regula varios procesos metabólicos en el cuerpo. Los tipos principales de células endocrinas presentes en los islotes de Langerhans son:

1. Células beta: Estas células son fundamentales para la regulación del azúcar en sangre. Producen insulina, una hormona que facilita la absorción de glucosa en las células, reduciendo así los niveles de azúcar en sangre.
2. Células alfa: Estas células producen glucagón, otra hormona crucial para el control de la glucosa en sangre. El glucagón promueve la liberación de glucosa almacenada en el hígado, lo que aumenta los niveles de azúcar en sangre cuando son demasiado bajos.
3. Células delta: Estas células producen somatostatina, una hormona que regula la liberación de insulina y glucagón, ayudando a mantener un equilibrio en los niveles de azúcar en sangre.
4. Células gamma: A diferencia de las otras células endocrinas, las células gamma no son tan comunes y su función no está tan bien definida. Estas células se asocian principalmente con la producción de la hormona pancreática polipéptido, que regula la función exocrina pancreática, incluyendo la liberación de enzimas digestivas en el intestino tras la ingesta de alimentos.

Células Exocrinas

La mayor parte del páncreas está compuesta por células exocrinas, las cuales están involucradas en la digestión. Estas células producen enzimas digestivas que se liberan en los conductos pancreáticos y finalmente llegan al intestino delgado. Las enzimas pancreáticas son esenciales para descomponer los alimentos en nutrientes más pequeños, como proteínas, grasas y carbohidratos, para que puedan ser absorbidos por el cuerpo. Los tipos de células exocrinas incluyen:

1. Células acinares: Son las principales responsables de la producción de enzimas digestivas. Estas enzimas incluyen lipasas, amilasas y proteasas, que descomponen los lípidos, carbohidratos y proteínas respectivamente.
2. Células ductales: Estas células recubren los conductos pancreáticos y son responsables de la producción y secreción de bicarbonato y líquidos, que neutralizan la acidez del quimo proveniente del estómago y ayudan en la digestión.

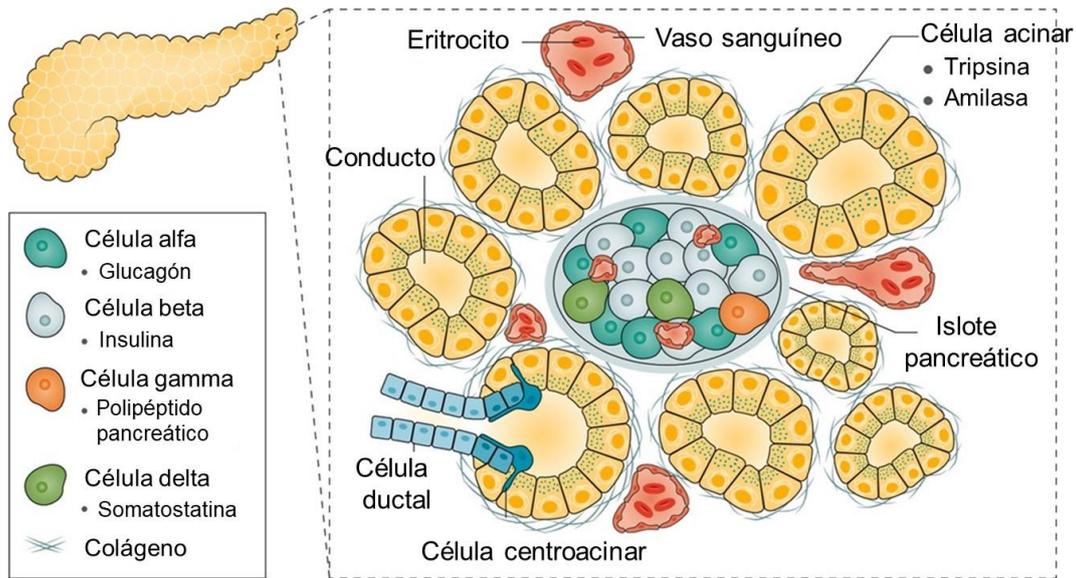


Figura 2.35. Tipos de células (endocrinas y exocrinas) presentes en el páncreas. Imagen traducida de Ellis et al., 2017.

La colaboración entre las células endocrinas y exocrinas es crucial para mantener un equilibrio en el cuerpo. La disfunción en cualquiera de estos tipos de células puede tener impactos significativos en la salud, como en el caso de la diabetes cuando las células beta no producen suficiente insulina. Por tanto, comprender la interacción entre estos tipos de células es esencial para el tratamiento y la prevención de trastornos pancreáticos y metabólicos.

En general, se emplea el adenocarcinoma pancreático ductal como modelo de cáncer de páncreas, ya que representa más del 90% de todos los tumores pancreáticos (Jiang et al., 2022). Estos tumores se originan a partir de las células ductales que revisten los pequeños conductos en el páncreas, y con frecuencia están asociados con la expresión de *KRAS* mutante.

2.3.2. Patogénesis del cáncer de páncreas

La patogénesis del cáncer de páncreas es un proceso complejo que involucra una serie de cambios genéticos, moleculares y celulares. La mayoría de los cánceres de páncreas se desarrollan a partir de las células exocrinas del páncreas, específicamente en los conductos pancreáticos, siendo el PDAC el tipo más común de cáncer de páncreas. Durante el desarrollo del tumor, se observa una acumulación de diferentes alteraciones genéticas (**Figura 2.36**). Las mutaciones oncogénicas más frecuentes para PDAC son mutaciones activadoras de *KRAS* e inactivadoras en genes supresores de tumores como *CDKN2A/p16*, *SMAD4* y *TP53* (Ying et al., 2016).

Estas mutaciones iniciales, destacando la activación de KRAS, impulsan bien una transformación de las propias células ductales o bien una transición de células exocrinas llamada metaplasia acinar a ductal (ADM, *acinar-to-ductal metaplasia*), en la cual las células acinares pierden su diferenciación y adoptan características de las células ductales o epiteliales (Orth et al., 2019). De esta forma, aparecen lesiones precursoras, que incluyen las neoplasias intraepiteliales (PanIN, *pancreatic intraepithelial neoplasia*), siendo las más frecuentes, y, en menor medida, las neoplasias mucinosas pancreática intraductal (IPMN, *intraductal pancreatic mucinous neoplasia*) y las neoplasias quísticas mucinosas (MCN, *mucinous cystic neoplasia*). Estas lesiones pueden presentarse en el páncreas durante años antes de desarrollarse el cáncer invasivo. A medida que las células tumorales acumulan más mutaciones, se vuelven más agresivas y adquieren la capacidad de invadir tejidos circundantes y propagarse a otras partes del cuerpo. En este sentido, las neoplasias intraepiteliales pancreáticas se dividen en tres etapas (PanIN-1, PanIN-2 y PanIN-3), ya que presentan una progresiva alteración en la apariencia celular, así como un incremento en la cantidad de mutaciones genéticas (**Figura 2.36**). Con el tiempo, el cáncer de páncreas puede propagarse a órganos distantes, como el hígado, los pulmones y los ganglios linfáticos.

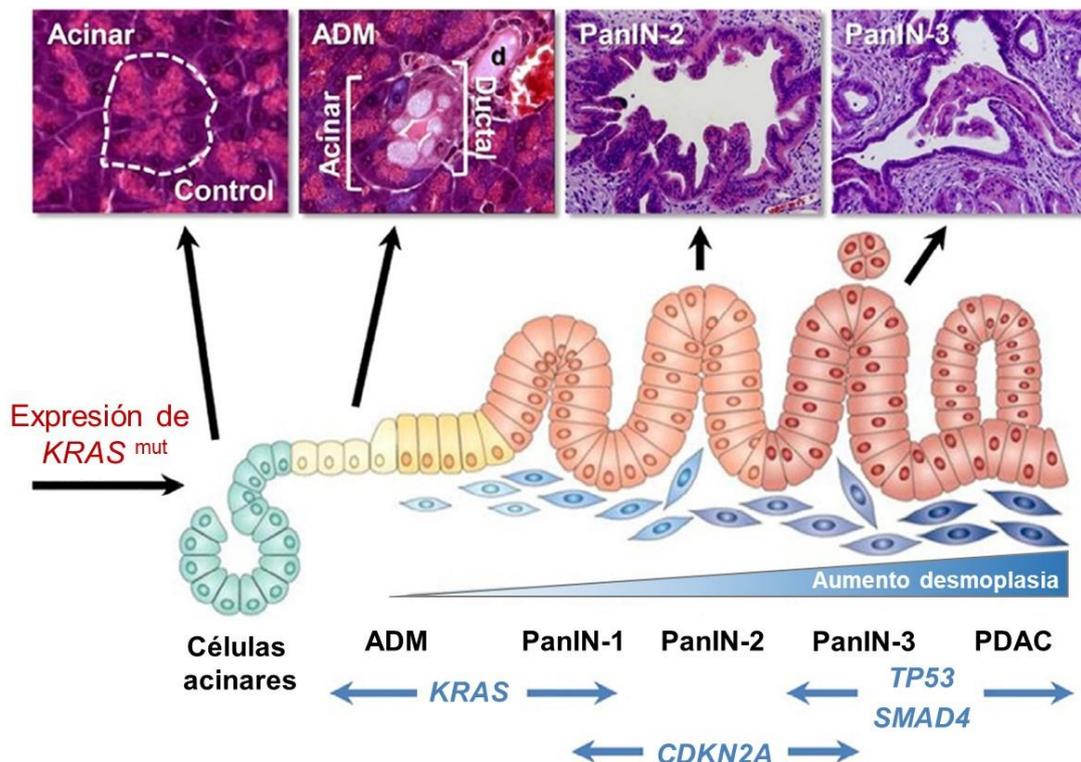


Figura 2.36. Representación esquemática e histológica del desarrollo gradual del cáncer de páncreas. ADM: metaplasia acinar-ductal, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten, PanIN: neoplasia intraepitelial pancreática, PDAC: adenocarcinoma pancreático ductal. Imagen traducida de Choi et al., 2020.

2.3.3. Epidemiología

El cáncer de páncreas es una de las formas más mortales de cáncer a nivel mundial (**Figura 2.37A**). Según los datos facilitados por GLOBOCAN, se estima que en 2040 habrá alrededor de 300000 nuevos casos diagnosticados (**Figura 2.37B**) en todo el mundo, así como un número similar de fallecidos, con una tendencia muy parecida en ambos sexos (**Figura 2.37C**).

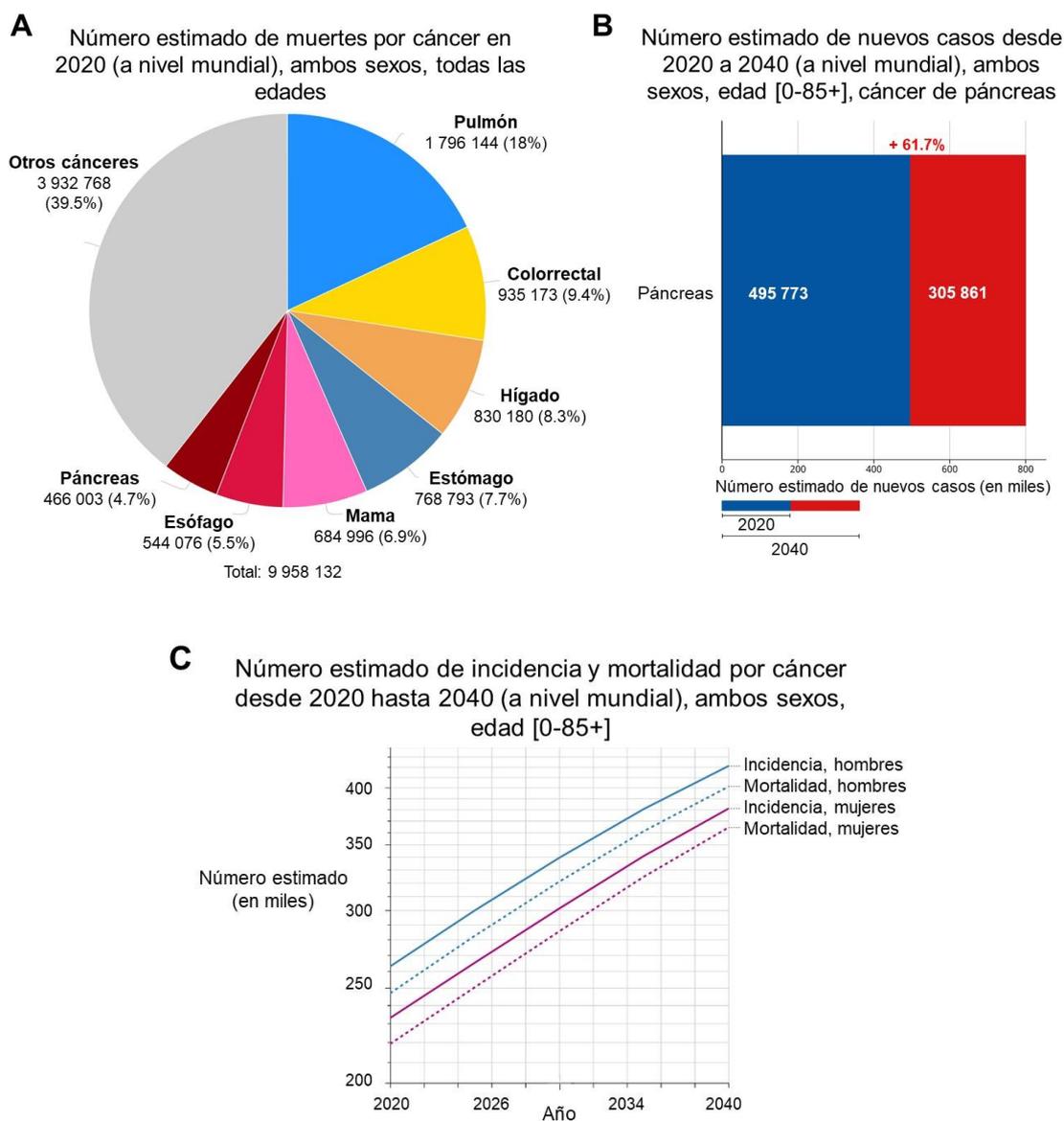


Figura 2.37. Datos estimados de muertes por cáncer, de nuevos casos de cáncer de páncreas y de su incidencia/mortalidad, a nivel mundial. **A)** Número estimado de muertes por cáncer en 2020. **B)** Número estimado de nuevos casos de cáncer de páncreas desde 2020 hasta 2040. **C)** Incidencia y mortalidad para el cáncer de páncreas desde 2020 hasta 2040. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

La incidencia de cáncer de páncreas, en función de la tasa estandarizada por edad (ASR, *age-standardized rate*), es más alta en Europa (7.9 por 100000 personas) y América del Norte (7.7 por 100000 personas), seguida de Oceanía (6.7 por 100000 personas). La tasa más baja se observa en África con una incidencia estimada de 2.3 por cada 100000 personas (**Figura 2.38**). Aunque no se conoce bien el motivo, es posible que el medio ambiente y/o la exposición a ciertos factores de riesgo sean responsables de la variación geográfica observada en la incidencia del cáncer de páncreas (Rawla et al., 2019).

Incidencia normalizada por la edad en 2020, cáncer de páncreas, ambos sexos, todas las edades

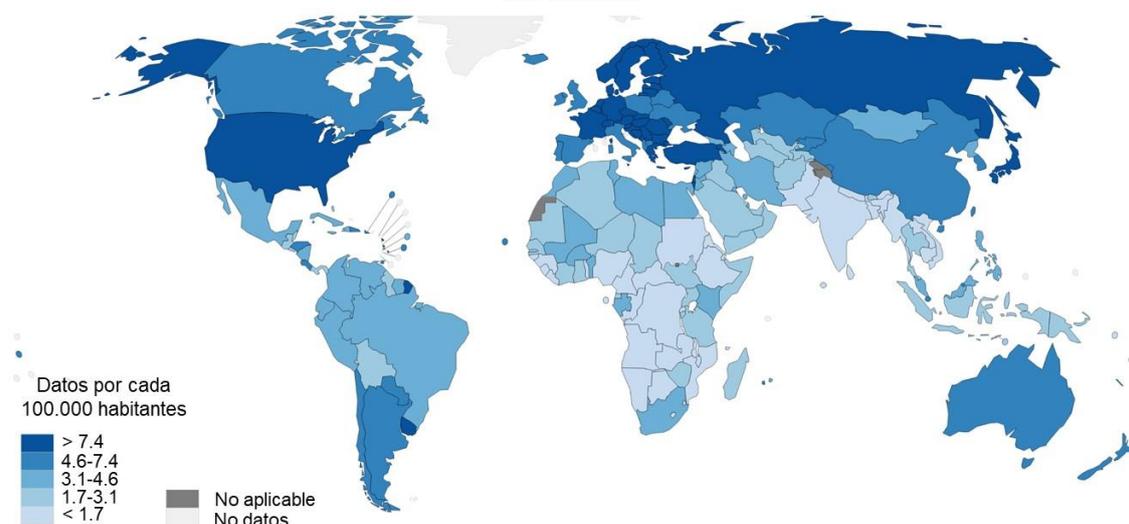


Figura 2.38. Datos estimados de las tasas de incidencia de cáncer de páncreas por cada 100000 habitantes en 2020, a nivel mundial. Imagen obtenida y traducida de GLOBOCAN el 10 de agosto de 2023.

El cáncer de páncreas se caracteriza por ser altamente agresivo debido a su rápida propagación, la falta de síntomas específicos en sus etapas iniciales y el diagnóstico tardío. La tasa de supervivencia relativa a 5 años para todos los cánceres ha aumentado en los últimos años, siendo la supervivencia actual más alta para los cánceres de tiroides (98%), próstata (97%) y testículos (95%), y la más baja para cánceres de hígado y esófago (21%) y páncreas (12%) (Siegel et al., 2023).

Según las últimas estimaciones de la base de datos GLOBOCAN, en 2020 se diagnosticaron 6.9 nuevos casos de cáncer de páncreas por cada 100000 habitantes. El último informe elaborado por la red española de registros de cáncer (REDECAN) calcula que solo en el año 2024 se diagnosticarán más de 9000 nuevos casos de cáncer de páncreas en España.

Es poco frecuente que el cáncer de páncreas sea detectado antes de los 55 años, y se puede caracterizar como una enfermedad que afecta principalmente a la población de edad avanzada, ya que la mayor incidencia se observa en individuos mayores de 70 años (Rawla et al., 2019).

2.3.4. Factores de riesgo

Los principales elementos que aumentan la probabilidad de desarrollar cáncer de páncreas pueden dividirse en dos categorías: no modificables (edad, género, ubicación geográfica, grupo sanguíneo, predisposición genética y presencia de diabetes) y modificables (tabaquismo, alcohol, pancreatitis crónica, obesidad y la exposición a infecciones) (McGuigan et al., 2018; Midha et al., 2016; Zhao & Liu, 2020).

Factores de riesgo no modificables

El cáncer de páncreas tiende a afectar principalmente a los ancianos. La mayoría de los pacientes recién diagnosticados, alrededor del 90%, tienen más de 55 años, con un pico en la séptima y octava década de vida. En cuanto al género y área geográfica, la incidencia del cáncer de páncreas es mayor en hombres que en mujeres, con una mayor diferencia en países más desarrollados. Se observa una mayor tasa en norteamericanos y europeos y una menor en asiáticos e isleños del Pacífico. No obstante, estas diferencias en la incidencia entre grupos étnicos o ambos sexos no se pueden explicar únicamente por interacciones genéticas o ambientales. Asimismo, otras investigaciones han demostrado que el riesgo de desarrollar cáncer de páncreas está relacionado con diferentes tipos de grupos sanguíneos. Por ejemplo, a diferencia de los que son tipo O, aquellos con tipos A, AB o B tienen un mayor riesgo, posiblemente relacionado con procesos de inflamación y regulación inmunológica. Además, el componente genético es uno de los principales factores de riesgo. Se considera que el cáncer de páncreas es de origen familiar si dos o más familiares de primer grado han tenido la enfermedad, representando del 5% al 10% de los nuevos casos. Aquellos con antecedentes familiares tienen un riesgo significativamente mayor de desarrollar la enfermedad, y este riesgo se incrementa aún más si hay tres o más familiares con diagnóstico previo. Las personas con antecedentes familiares de cáncer de páncreas tienen un riesgo 80% mayor de desarrollar adenocarcinoma de páncreas en comparación con aquellos sin antecedentes familiares. Igualmente, se asocia un mayor riesgo de sufrir cáncer de páncreas en personas con diabetes, particularmente en casos de larga duración.

Factores de riesgo modificables

El hábito de fumar es identificado como el factor modificable de mayor relevancia en el riesgo de cáncer de páncreas. Se ha demostrado que tanto fumadores como exfumadores presentan un mayor riesgo de sufrir cáncer de páncreas en comparación con quienes nunca han fumado. Aunque la influencia del consumo de alcohol no se considera como un factor de riesgo evidente, se ha visto que el consumo alto de alcohol se asocia con un incremento del riesgo de cáncer de páncreas. Asimismo, el consumo excesivo de alcohol es un factor determinante en la pancreatitis crónica, condición relacionada y también un riesgo para el desarrollo de cáncer de páncreas. La creciente evidencia sugiere que la pancreatitis crónica es un factor de riesgo independiente para el cáncer de páncreas. La pancreatitis crónica es un proceso inflamatorio progresivo en el páncreas que resulta en fibrosis pancreática y pérdida de tejido acinar e islotes. Los episodios recurrentes de pancreatitis crónica pueden acelerar la progresión de la enfermedad y llevar a insuficiencia endocrina, lo que, en última instancia, resulta en enzimas pancreáticas anormales. Por otro lado, la evidencia epidemiológica respalda la idea de que la obesidad representa un factor de riesgo de importancia en el desarrollo del cáncer de páncreas. Se ha demostrado que el proceso de oxidación de lípidos permite que las células cancerosas tengan la flexibilidad de utilizar fuentes de carbono alternativas y fácilmente disponibles para sus procesos de biosíntesis. Además, se ha explorado la relación entre diversas infecciones y la aparición del cáncer de páncreas, evidenciándose mayores niveles de riesgo en individuos con infecciones como la ocasionada por el *Helicobacter pylori* o la hepatitis C.

2.3.5. Bases moleculares del cáncer de páncreas

Las alteraciones genéticas desempeñan un papel central en la etiología y progresión del cáncer de páncreas, una enfermedad altamente agresiva. A lo largo de las últimas décadas, se ha revelado un panorama genético complejo en el cáncer de páncreas, caracterizado por una serie de mutaciones y alteraciones en genes específicos que regulan funciones celulares cruciales, incluidas las rutas de señalización RAS, TGF- β , Wnt, Notch y de Hedgehog, así como de entrada en fase S, remodelación de cromatina, reparación de ADN y procesamiento de ARN (Bailey et al., 2016; Jones et al., 2008). Estas anomalías genéticas no solo desencadenan la transformación de células normales en malignas, sino que también tienen un impacto profundo en la agresividad del tumor, su capacidad para evadir los mecanismos de control del cuerpo y su respuesta a las terapias convencionales.

La ruta de señalización RAS está implicada en la activación de tres rutas efectoras principales, la de RAL-A/B, RAF/MEK/ERK y PI3K (Wang et al., 2021). La activación oncogénica de RAS debido a mutaciones sin sentido se detecta con frecuencia en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de páncreas (Pylayeva-Gupta et al., 2011). Dado que las mutaciones en una isoforma de la proteína RAS, KRAS, se encuentran en casi el 90% de los cánceres de páncreas, la ruta de señalización RAS parece desempeñar un papel crítico tanto en el inicio como en el mantenimiento del cáncer de páncreas. Además, los cánceres de páncreas sin mutaciones en *KRAS* muestran activación de RAS a través de la estimulación de los receptores tirosina quinasa (RTK, *receptor tyrosine kinase*) y la formación del complejo MRAS-SHOC2-PP1C (**Figura 2.39**). En este sentido, las proteínas RAF son posiblemente los efectores RAS más importantes que, una vez activados, inician la cascada de señalización MAPK para impulsar la proliferación y supervivencia celular (Lavoie & Therrien, 2015).

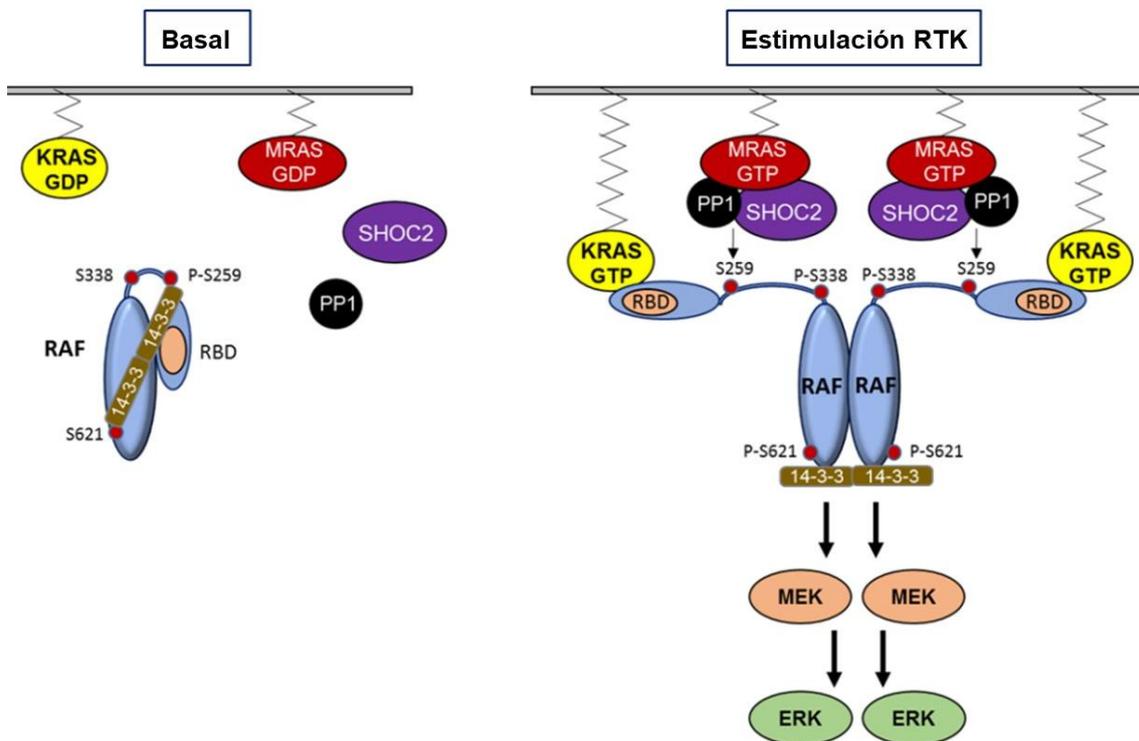


Figura 2.39. Función del complejo MRAS-SHOC2-PP1C fosfatasa. ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GDP: difosfato de guanosina, GTP: trifosfato de guanosina, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de *Kirsten*, MEK: quinasa activada por mitógenos, MRAS: MRAS: homólogo del oncogén RAS muscular, RAF: quinasa responsable del “fibrosarcoma rápidamente acelerado”, RBD: dominio de unión a RAS, RTK: receptor de tirosina quinasa. Imagen traducida de Jones, 2018.

En condiciones normales, la señalización de la ruta RAS-MAPK está estrechamente controlada en varios niveles para mantener las quinasa RAF en una conformación

autoinhibida mediante interacciones con el dímero 14-3-3 y distintos fosforresiduos reguladores de RAF. En cambio, la estimulación de RTK origina la desfosforilación de Ser259 de CRAF (Ser365 de BRAF y Ser214 de ARAF) mediante la acción de la holofosfatasa MRAS-SHOC2-PP1C (**Figura 2.39**). Este proceso provoca la disociación parcial de la proteína 14-3-3, lo que a su vez permite la unión de RAF a RAS, representando así un paso crucial en la iniciación de la señalización MAPK (Hauseman et al., 2022).

No obstante, uno de los eventos genéticos más frecuente en el cáncer de páncreas es la activación mutacional del oncogén *KRAS*. Esta mutación desencadena una cascada de cambios celulares que promueven el crecimiento descontrolado y la supervivencia de las células cancerosas. Asimismo, la inactivación de determinados genes supresores de tumores desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cáncer de páncreas, permitiendo que las células tumorales eviten los mecanismos de parada del ciclo celular, apoptosis y supervisión del ADN dañado (Grant et al., 2016).

Oncogén *KRAS*

Las mutaciones que activan *KRAS* son el rasgo genético distintivo en la evolución del cáncer de páncreas y se presentan en alrededor del 92% de los casos de adenocarcinoma pancreático (Bailey et al., 2016). *KRAS*, perteneciente a la superfamilia RAS, codifica una pequeña GTPasa que regula varios procesos celulares, incluyendo proliferación, diferenciación, supervivencia y migración celular (Downward, 2003). La familia de proteínas RAS humanas contienen cuatro residuos C-terminales al final del dominio anclado a la membrana que forman el motivo CAAX, donde C indica cisteína, A cualquier residuo alifático y X el aminoácido terminal. Un grupo farnesilo C15 (un isoprenoide llamado farnesol) se une covalentemente al residuo de cisteína del motivo CAAX mediante enzimas conocidas como farnesiltransferasas (Cox et al., 2015). Este grupo lipídico tiene un papel fundamental en el anclaje a la membrana y es esencial para la actividad biológica de la proteína *KRAS*. En condiciones normales, *KRAS* alterna entre estados activos unidos a GTP e inactivos unidos a GDP. Esta transición está controlada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEF, *guanine nucleotide exchange factors*), que catalizan el reemplazo de GDP por GTP, y proteínas activadoras de la GTPasa (GAP, *GTPase-activating proteins*), que mejoran la inherente debilidad de *KRAS* para la hidrólisis de GTP (Stephen et al., 2014). La activación de *KRAS* ocurre cuando está enlazada con GTP y su desactivación se produce cuando está unida a GDP. Una vez que la proteína *KRAS* se une a GTP, establece interacciones con más de 80 proteínas efectoras en cascadas descendentes y rutas de señalización,

tales como las rutas RALGEF, NF- κ B, JNK, MAPK, PI3K/AKT/mTOR y RAF/MEK/ERK (**Figura 2.40**). Los factores de transcripción nucleares también se activan (como ELK, JUN y MYC), lo que resulta en la estimulación de funciones celulares como la diferenciación, proliferación, migración, transformación, adhesión y supervivencia (Buscail et al., 2020).

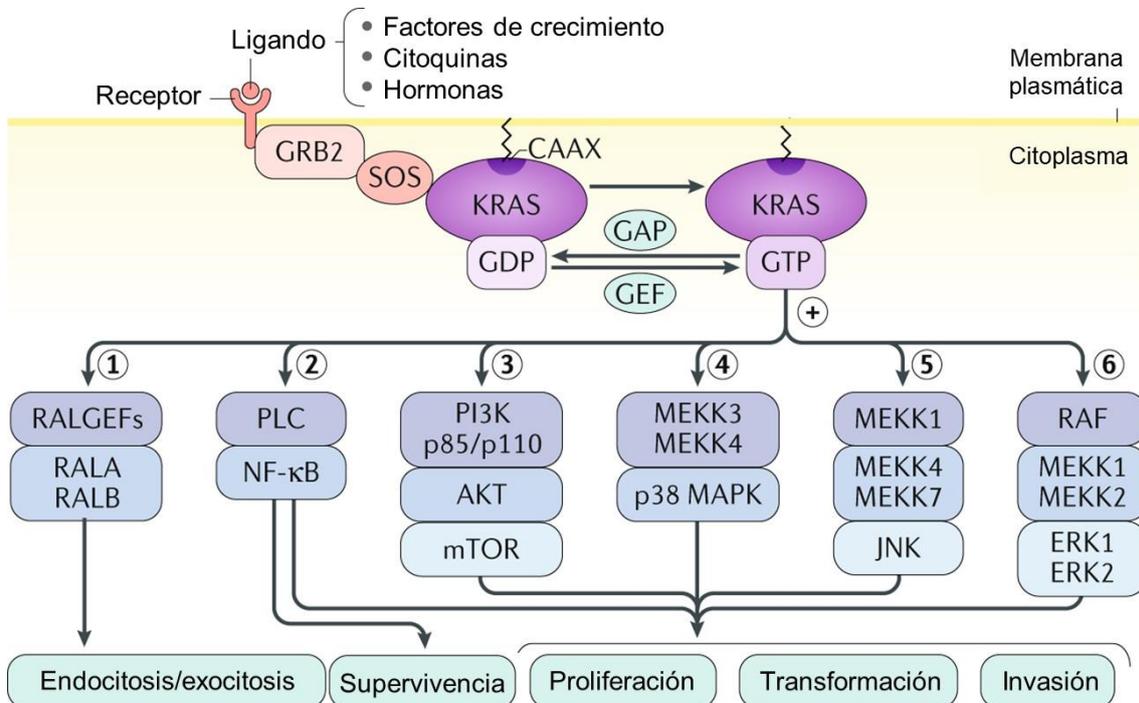


Figura 2.40. Activación de la proteína KRAS y las vías intracelulares implicadas. AKT: proteína quinasa B, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, GAP: proteína activadora de GTPasa, GDP: difosfato de guanosa, GEF: factor de intercambio de nucleótidos de guanina, GRB2: proteína 2 unida al receptor del factor de crecimiento, GTP: trifosfato de guanosa, JNK: quinasa Jun N-terminal, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten, MAPK: quinasa activada por mitógenos, MEK: quinasa quinasa activada por mitógenos, mTOR: proteína diana de la rapamicina en mamíferos, NF- κ B: factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas, PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa, PLC: fosfolipasa C, RAF: quinasa responsable del “fibrosarcoma rápidamente acelerado”, RAL-A/B: proteína A/B similar a Ras, SOS: factor de intercambio de nucleótidos de guanina de especificidad dual. Imagen traducida de Buscail et al., 2020.

En general, una mutación puntual activadora del oncogén *KRAS* en el codón 12 (exón 2) es el evento iniciador en la mayoría de los casos de cáncer de páncreas. Esta mutación de un solo nucleótido desencadena el reemplazo de la secuencia GGT (que codifica la glicina) por la secuencia GAT (ácido aspártico; G12D), GTT (valina; G12V), CGT (arginina; G12R) o GCT (alanina; G12A). También pueden ocurrir otras mutaciones puntuales, aunque con menos frecuencia, en los codones 11, 13, 61 o 146 (Buscail et al., 2020). La mutación puntual de *KRAS* altera la actividad GTPasa intrínseca de

RAS y evita que las GAP promuevan la conversión de GTP (activo) a GDP (inactivo). Por tanto, la proteína KRAS se une permanentemente a GTP y desencadena una estimulación constante de las rutas efectoras capaces de impulsar el desarrollo tumoral. Sin embargo, se ha visto que las mutaciones de *KRAS* por sí solas no son suficientes para promover la progresión del cáncer de páncreas, sino que aparecen combinadas con la inactivación de genes supresores de tumores, tales como *CDKN2A*, *TP53*, *LKB1* y *SMAD4* (Schneider & Schmid, 2003).

Genes supresores de tumores

Los genes supresores de tumores limitan la proliferación celular en presencia de mutaciones oncogénicas al inducir la parada del ciclo celular, la apoptosis o la senescencia. Por tanto, la inactivación funcional de estos genes resulta esencial para la tumorigénesis en el contexto del cáncer de páncreas, siendo los más frecuentes *CDKN2A*, *TP53*, *LKB1* y *SMAD4*. Además, la inactivación de estos genes ocurre de manera progresiva después de que surja la mutación oncogénica *KRAS* (Grant et al., 2016).

CDKN2A codifica la proteína p16^{INK4A}, un inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina que bloquea la entrada en la fase S del ciclo celular (Sherr, 2001). Es el gen supresor de tumores más temprano y comúnmente alterado en el cáncer de páncreas. La pérdida de *CDKN2A* es crucial en la patogénesis de la enfermedad, ya que p16^{INK4A} induce la senescencia después de la introducción del oncogén *KRAS* (Zhang et al., 2007). Por lo tanto, la inactivación de *CDKN2A* ocurre inmediatamente después de la aparición de las mutaciones activadoras de *KRAS*, con una frecuencia similar, para evitar la respuesta de senescencia. El gen supresor de tumores *CDKN2A* también codifica la proteína p14^{ARF}, que provoca la parada del crecimiento o la apoptosis al inhibir la proteólisis de p53 dependiente de MDM2. Sin embargo, se ha visto que la pérdida de la proteína p16^{INK4A} es más crítica en la patogénesis de la enfermedad (Sherr, 2001).

Otro gen supresor de tumores relevante en el cáncer de páncreas es *TP53*, que codifica el factor de transcripción p53. Las mutaciones que impiden la unión de p53 al ADN bloquean la expresión de genes que promueven la parada del ciclo celular o la apoptosis (por ejemplo, *CDKN1A*, *BAX*, *NOXA* y *PUMA*) en respuesta al estrés celular o daño en el ADN (Khoo et al., 2014). La inactivación de p53 normalmente se observa en lesiones intraepiteliales pancreáticas (PanIN) avanzadas después de la pérdida de *CDKN2A* (Maitra et al., 2003). En esta etapa de la progresión de la enfermedad, se cree que la acumulación de daño en el ADN induce una presión selectiva que requiere la inactivación de p53 para favorecer la supervivencia y el crecimiento sin control de las

células tumorales. Sin embargo, se ha demostrado que la mayoría de las alteraciones de *TP53* son mutaciones sin sentido que muestran fenotipos de ganancia de función que incluyen aumento de la invasividad y metástasis (Kim et al., 2021).

Aunque *CDKN2A* y *TP53* se consideran los genes supresores de tumores clásicos, ya que desempeñan un papel crucial en la inhibición del crecimiento tumoral, se ha observado en el cáncer de páncreas la inactivación de otros genes como *LKB1* y *SMAD4* (Maitra & Hruban, 2008).

El gen *LKB1* (también conocido como *STK11*) codifica una serina/treonina quinasa que juega un papel crucial en la regulación del crecimiento celular, el metabolismo y la polaridad celular. Se ha encontrado que las mutaciones en el gen *LKB1* están asociadas con varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de páncreas (Hezel & Bardeesy, 2008). Las mutaciones en *LKB1* a menudo se asocian con un perfil más agresivo y resistente al tratamiento en el cáncer de páncreas. Los tumores que presentan mutaciones en *LKB1* pueden tener una mayor invasión local, metástasis temprana y una respuesta limitada a ciertas terapias.

El gen *SMAD4*, también conocido como *DPC4*, participa en la regulación de la señalización de la ruta de TGF- β y la ruta de señalización de la familia de proteínas SMAD. Este gen codifica una proteína involucrada en la transducción de señales del factor de crecimiento TGF- β , una ruta importante en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, así como en la inhibición de la proliferación celular. Cuando *SMAD4* está mutado o su función está alterada, se puede desregular la ruta de señalización del TGF- β , lo que contribuye a la proliferación celular descontrolada y la pérdida de la capacidad de frenar el crecimiento celular, lo que provoca un avance tumoral acelerado. La mayoría de los casos de cáncer de páncreas presentan mutaciones con pérdida de función de *SMAD4* debido a la mutación simultánea en el gen supresor de tumores *CDKN2A* y la activación del oncogén *KRAS* (Bardeesy et al., 2006).

Además, el acortamiento de los telómeros se ha identificado en más del 90% de las lesiones intraepiteliales pancreáticas de bajo grado, lo que sugiere que constituye un evento temprano en la tumorigénesis del cáncer de páncreas (van Heek et al., 2002). Cuando los telómeros se vuelven excesivamente cortos, se fomenta una inestabilidad genómica que puede ejercer una presión selectiva para eliminar las rutas antiapoptóticas y favorecer la formación de tumores. Esto normalmente debería resultar en la senescencia inducida por p53 (Chin et al., 1999). Sin embargo, la frecuente inactivación de p53 mantiene la proliferación ininterrumpida de las células tumorales. En

este sentido, la reactivación de la telomerasa puede impulsar la progresión del tumor al posibilitar la inmortalización celular, permitiendo así la extensión sostenida de los telómeros a lo largo de múltiples rondas de replicación del ADN.

2.3.6. Diagnóstico

A pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento en la última década, la tasa de supervivencia a 5 años para el cáncer de páncreas es aproximadamente del 12% (Siegel et al., 2023).

El diagnóstico del cáncer de páncreas involucra un conjunto de pruebas médicas y exámenes de imágenes para confirmar la presencia de la enfermedad. Estas pruebas incluyen un examen físico que busca signos de ictericia y cambios en el abdomen, análisis de sangre para controlar los niveles de bilirrubina, el antígeno carcinoembrionario (CEA) y el marcador tumoral CA19-9, y pruebas por imágenes como la tomografía computarizada, la tomografía por emisión de positrones y la ecografía, las cuales pueden mostrar el páncreas y detectar propagación a órganos adyacentes o distantes. Además, la resonancia magnética y la colangiopancreatografía por resonancia magnética proporcionan imágenes detalladas del páncreas y sus conductos. Sin embargo, para un diagnóstico definitivo, es esencial realizar una biopsia, como la biopsia por aspiración con aguja fina o la biopsia con aguja gruesa (conocida como *core*), ya que permite obtener y analizar pequeñas muestras del tejido del tumor. Estas pruebas en conjunto proporcionan una visión completa y precisa del cáncer de páncreas, permitiendo un tratamiento adecuado y oportuno.

2.3.7. Clasificación de los estadios del cáncer de páncreas

El sistema de clasificación según el tamaño, la afectación ganglionar y la presencia de metástasis establecido por la AJCC permite describir la extensión y el estadio de diversos tipos de cáncer. De esta forma, el cáncer de páncreas se puede clasificar en cuatro estadios (**Tabla 2.2**):

Estadio 0 (carcinoma <i>in situ</i>)	El cáncer se localiza en las capas superiores de las células pancreáticas y no ha invadido los tejidos más profundos.	
Estadio I (tumor localizado)	IA	El cáncer está confinado en el páncreas y no mide más de 2 cm de ancho.
	IB	El cáncer está confinado en el páncreas y mide entre 2 y 4 cm de ancho.
Estadio II (propagación regional)	IIA	El cáncer está confinado en el páncreas y mide más de 4 cm de ancho.
	IIB	El cáncer está confinado en el páncreas, no mide más de 2 cm de ancho y se ha extendido hasta 3 ganglios linfáticos adyacentes.
Estadio III (propagación regional)	IIIA	El cáncer está confinado en el páncreas, no mide más de 2 cm de ancho y se ha extendido a más de 4 ganglios linfáticos adyacentes.
	IIIB	El cáncer está confinado en el páncreas, mide entre 2 y 4 cm de ancho y se ha extendido a más de 4 ganglios linfáticos adyacentes.
	IIIC	El cáncer está confinado en el páncreas, mide más de 4 cm de ancho y se ha extendido a más de 4 ganglios linfáticos adyacentes.
	IIID	El cáncer está creciendo fuera del páncreas y en los vasos sanguíneos principales adyacentes, pero no se ha extendido a sitios distantes.
Estadio IV (metástasis)	El cáncer se ha extendido a sitios distantes tales como el hígado, el peritoneo (la membrana que recubre la cavidad abdominal), los pulmones o los huesos. El tumor puede ser de cualquier tamaño y puede o no haberse diseminado a los ganglios linfáticos cercanos.	

Tabla 2.2. Diferentes estadios del cáncer de páncreas.

2.3.8. Tratamiento

La tasa de supervivencia general a 5 años para el cáncer de páncreas ha experimentado cambios mínimos en las últimas décadas, y se proyecta que este tipo de cáncer será la segunda causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer en los países occidentales en la próxima década. Aunque ha habido avances en la comprensión de la enfermedad y en el desarrollo de nuevas terapias, el pronóstico general para los pacientes con cáncer de páncreas sigue siendo desalentador debido a su diagnóstico en etapas avanzadas y a su resistencia a muchos tratamientos convencionales.

El tratamiento del cáncer de páncreas se basa principalmente en quimioterapia y cirugía. Sin embargo, solo un 15-20% de los pacientes son candidatos para cirugía en el momento del diagnóstico (Kleeff et al., 2016). La mayoría de los pacientes tienen metástasis en ese momento, lo que hace que la extirpación de la lesión primaria mediante cirugía sea poco probable que tenga un impacto positivo. Además, la cirugía para extirpar parte del páncreas, a menudo junto con una porción del duodeno y la creación de nuevas conexiones, es una intervención importante que puede tener efectos duraderos en la digestión y el metabolismo del paciente (Halbrook et al., 2023).

En términos de atención clínica, la mayoría de los pacientes, independientemente de la elegibilidad quirúrgica, reciben quimioterapia sistémica. En la última década, han surgido dos sistemas combinados como terapia de primera línea para el cáncer de páncreas avanzado. El primero es una combinación de 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, irinotecán y oxaliplatino, conocida como FOLFIRINOX. El segundo es una combinación de gemcitabina y una formulación de albúmina de paclitaxel en nanopartículas, conocida como Nab-paclitaxel (Conroy et al., 2011; Von Hoff et al., 2013). Los pacientes que no responden a estos tratamientos de primera línea pueden cambiar a un sistema de segunda línea que involucra una formulación liposomal de irinotecan en combinación con 5-FU, siempre que no hayan sido tratados previamente con estos agentes (Wang-Gillam et al., 2016).

Desafortunadamente, incluso en los casos donde se puede realizar una extirpación quirúrgica, casi 3 de cada 4 pacientes experimentarán una recurrencia dentro de los 2 años siguientes, lo que sugiere que la enfermedad micrometastásica persiste en pacientes sometidos a extirpación (Groot et al., 2018). Por tanto, con el fin de aumentar la posibilidad de erradicar las células tumorales de páncreas que han escapado del tumor primario antes o durante la cirugía, a menudo se administra quimioterapia

adyuvante a los pacientes que se someten a cirugía. Dependiendo del estado funcional del paciente, esta quimioterapia puede ser una modificación del sistema original de FOLFIRINOX o una combinación de compuestos, como gemcitabina y cisplatino o gemcitabina y nab-paclitaxel (Conroy et al., 2018; Neoptolemos et al., 2017; Tempero et al., 2023).

A pesar de que la cirugía y la quimioterapia continúan siendo las primeras opciones del abordaje clínico del cáncer pancreático, en los últimos años ha habido avances significativos en la implementación de terapias específicas para esta enfermedad, destacando las terapias dirigidas y la inmunoterapia.

Los esfuerzos para desarrollar estrategias terapéuticas contra los impulsores oncogénicos del cáncer de páncreas, en particular *KRAS*, se han enfrentado a numerosos desafíos debido a la consideración de las oncoproteínas *KRAS* como moléculas no susceptibles de tratamiento. Dado que la mayoría de las oncoproteínas *KRAS* siguen sin poder ser tratadas con fármacos, el enfoque se ha desplazado hacia la inhibición de la señalización de MAPK aguas abajo (Drosten & Barbacid, 2020).

Uno de los primeros fármacos destinados a bloquear la señalización de *KRAS*/MAPK en tumores con mutaciones *KRAS* fue el sorafenib, el cual mostró inicialmente unos resultados prometedores, pero no llegaron a ser concluyentes (Kindler et al., 2012). Los inhibidores selectivos para el melanoma impulsado por la mutación *BRAF*^{V600E}, como el vemurafenib, no mostraron beneficios para los cánceres impulsados por *KRAS* mutante (Durrant & Morrison, 2018). Los inhibidores de MEK, como el trametinib, se aprobaron para algunos melanomas, pero no lograron mostrar beneficios de supervivencia significativos para los cánceres provocados por *KRAS* mutante (Drosten & Barbacid, 2020). Además, se están explorando varios inhibidores de la quinasa ERK, ya que pueden ser clave para aquellos pacientes que desarrollan resistencia a los inhibidores de RAF o MEK (Ryan et al., 2015).

Por último, aunque la inmunoterapia ha tenido un gran éxito en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el melanoma, no se ha conseguido todavía que sea una estrategia efectiva para el tratamiento del cáncer de páncreas. Esto puede ser debido a la naturaleza inmunosupresora del microambiente en el cáncer de páncreas (Neoptolemos et al., 2018). Además, se ha demostrado que el cáncer de páncreas es prácticamente insensible a los inhibidores de puntos de control inmunitario, probablemente debido al hecho de que este tipo de tumores generan pocos neoantígenos que induzcan la acción de las células T. Sin embargo, recientemente, se ha diseñado una vacuna de neoantígeno individualizada basada en nanopartículas de

ARNm de uridina-lipoplex que, en combinación con atezolizumab y FOLFIRINOX, induce una actividad sustancial de células T en pacientes con cáncer de páncreas (Rojas et al., 2023).

2.3.9. Autofagia como mecanismo protector

La activación por mutación de *KRAS* es el principal impulsor genético que inicia y promueve el adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC), y resulta esencial para mantener el crecimiento cancerígeno de esta enfermedad (Ying et al., 2012). Dado que aproximadamente el PDAC representa el 90% de todos los cánceres de páncreas y que el 95% de los casos de PDAC presentan mutaciones activadoras en *KRAS*, el Instituto Nacional del Cáncer (NCI) de los Estados Unidos ha destacado el desarrollo de terapias dirigidas a *KRAS* como una de las cuatro principales prioridades en la investigación sobre el cáncer de páncreas (Waters & Der, 2018). Una estrategia particularmente prometedora se centra en abordar los mecanismos responsables de las funciones metabólicas que dependen de *KRAS* y que respaldan las altas demandas de energía del PDAC (Kimmelman, 2015). Una de estas funciones es la autofagia, un proceso que implica la degradación de orgánulos y macromoléculas con el fin de reciclar los residuos celulares (Guo & White, 2016).

Durante el proceso de autofagia, se forma una estructura en expansión conocida como fagóforo, que rodea componentes del citoplasma (**Figura 2.41**). Esto conduce a la formación de vesículas de doble membrana, conocidas como autofagosomas. Estos autofagosomas se fusionan con los lisosomas, exponiendo el contenido interno a las enzimas hidrolíticas presentes en los lisosomas. Finalmente, la membrana interna del autofagosoma, junto con la carga contenida, se degrada, y las macromoléculas resultantes se liberan en el citosol a través de permeasas en la membrana lisosomal para su reciclaje.

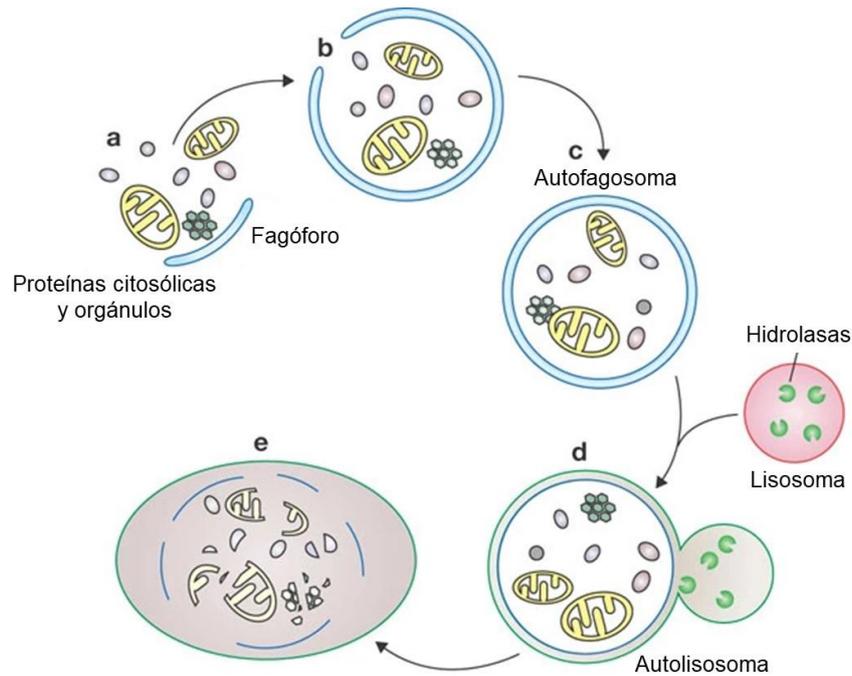


Figura 2.41. Representación esquemática del proceso de autofagia. Imagen traducida de Xie & Klionsky, 2007.

En condiciones normales, los niveles de autofagia en las células son bajos, pero pueden aumentar significativamente en respuesta al estrés y la escasez de nutrientes, lo que sugiere que la activación rápida de la autofagia es parte de la respuesta celular al estrés (Mizushima et al., 2004). La degradación de determinados componentes celulares mediante la autofagia, como proteínas dañadas y orgánulos anormales, proporciona aminoácidos libres para respaldar el metabolismo y la síntesis macromolecular, lo que confiere una ventaja de supervivencia en caso de inanición y promueve la tumorigénesis (Mathew et al., 2014).

A diferencia de las células normales, las células tumorales pueden presentar niveles elevados de autofagia basal y a menudo dependen de manera constante de este proceso para su supervivencia (Yang et al., 2011). Además, se ha observado que la autofagia se activa en áreas hipóxicas de los tumores, lo que proporciona una ventaja de supervivencia a las células cancerosas (Degenhardt et al., 2002). Estos descubrimientos plantean la posibilidad de que el bloqueo de la autofagia podría comprometer la supervivencia del tumor y representar una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer (Amaravadi et al., 2011).

Dos recientes estudios indican que cuando se bloquea la vía *KRAS* en cánceres con mutaciones en el gen *KRAS*, se vuelven dependientes de la autofagia para su supervivencia (Bryant et al., 2019; Kinsey et al., 2019). En ambos estudios, se demostró

que el uso de inhibidores de las quinasas MEK (MEKi) o ERK (ERKi) provocaban una mayor activación de la proteína quinasa activada por AMP (AMPK, *AMP-activated protein kinase*) y, posteriormente, la autofagia a través de la fosforilación de la quinasa ULK1 (**Figura 2.42**). Asimismo, la combinación de la inhibición de MEK o ERK y el bloqueo de la autofagia mediante cloroquina (CQ) o hidroxiclороquina (HCQ) mostró un efecto sinérgico en diversos modelos preclínicos de cáncer con mutaciones en *KRAS*.

En definitiva, estos hallazgos indican que la autofagia puede actuar como un mecanismo protector para satisfacer las necesidades metabólicas en los cánceres con mutaciones en *KRAS*, convirtiéndose en un mecanismo esencial para la supervivencia de las células tumorales. Además, sugieren que la combinación de inhibidores de las quinasas MEK o ERK con inhibidores de la autofagia podría tener beneficios terapéuticos en pacientes con cáncer de páncreas.

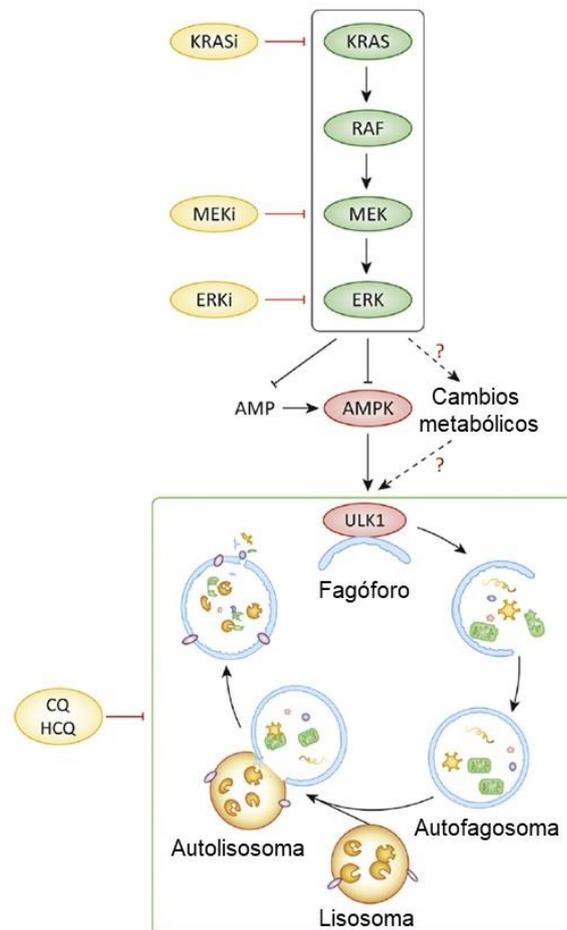


Figura 2.42. Inhibición de KRAS, MEK o ERK induce el flujo autofágico en células cancerosas a través de ULK1. AMPK: proteína quinasa activada por AMP, ERK: quinasa regulada por señales extracelulares, ERKi: inhibidor de ERK, CQ: cloroquina, HCQ: hidroxiclороquina, KRAS: homólogo del oncogén viral del sarcoma de rata de Kirsten, KRASi: inhibidor de KRAS, MEK: quinasa activada por mitógenos, MEKi: inhibidor de MEK, RAF: quinasa responsable del “fibrosarcoma rápidamente acelerado”, ULK1: quinasa específica de serina/treonina. Imagen traducida de Zhao & Zheng, 2019.

2.3.10. Bloqueo de los ciclos del ácido fólico y de la metionina como terapia hipometilante

Los tratamientos convencionales de extirpación quirúrgica, quimioterapia, radioterapia o terapias dirigidas presentan limitaciones, especialmente en pacientes con cáncer avanzado, lo que lleva a que aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados de cáncer mueran debido a la enfermedad, principalmente por metástasis. Por tanto, es necesario la identificación y el diseño nuevas opciones terapéuticas.

A pesar de que los mecanismos responsables de la carcinogénesis permanecen desconocidos en su mayoría, existen cada vez más evidencias que asocian la regulación aberrante de la metilación con el cáncer. Las enzimas que regulan el estado epigenético de las células desempeñan un papel importante en las modificaciones postraduccionales de ADN, histonas y factores de transcripción, lo que afecta a la expresión de genes y rutas metabólicas implicadas. Estas enzimas necesitan metabolitos como cofactores y sustratos para llevar a cabo sus funciones, lo que destaca la interacción entre la epigenética y el metabolismo como una nueva vía en la biología del cáncer y una posible fuente de nuevos tratamientos contra esta enfermedad.

Ciclo del ácido fólico

El ácido fólico (folato, en su forma aniónica), también conocido como vitamina B9, es una vitamina soluble en agua que se encuentra principalmente en vegetales de hoja verde y que resulta esencial para el desarrollo normal de los organismos. El ácido fólico en sí no tiene actividad como coenzima, pero su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico (THF), actúa como una verdadera coenzima facilitando la transferencia y el uso de grupos funcionales de carbono, como metilo, metileno y formilo. Estas reacciones citosólicas son cruciales en la síntesis de componentes como timidilato (que involucra la enzima timidilato sintasa), purinas y varios aminoácidos importantes, incluyendo serina, glicina, metionina e histidina. En consecuencia, el THF desempeña un papel fundamental en la síntesis de moléculas vitales como el ADN, ARN y proteínas (Shulpekova et al., 2021).

El ciclo del ácido fólico (**Figura 2.43**) comienza con la conversión del folato de la dieta (o vitamina B9) en 7,8-dihidrofolato (DHF), que luego se reduce a 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF) mediante la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR, *dihydrofolate reductase*). A continuación, el THF se convierte en 5,10-metilenTHF mediante la serina hidroximetiltransferasa (SHMT, *serine hydroxymethyltransferase*), una reacción que se

acopla con la hidroxilación de la serina (Ser) a glicina (Gly) y requiere B6 como cofactor. La timidilato sintasa (TS, *thymidylate synthase*) utiliza 5,10-metilenTHF como donante de grupo metilo para metilar el monofosfato de desoxiuridina (dUMP, *deoxyuridine monophosphate*), creando monofosfato de desoxitimidina (dTMP, *deoxythymidine monophosphate*). Este paso regenera DHF para un ciclo continuo. Alternativamente, el 5,10-metilenTHF se puede reducir mediante la metilentetrahidrofolato reductasa (MTHFR, *methylenetetrahydrofolate reductase*) a 5-metilenTHF (5-mTHF) utilizando B2 como cofactor.

Ciclo de la metionina

El ciclo de la metionina es un componente central del metabolismo. La metionina, un aminoácido esencial, desempeña funciones celulares críticas, como su participación en la síntesis de proteínas, en la formación de glutatión, que protege a las células contra el estrés oxidativo (Anderson, 1998), y en la producción de poliaminas, que regulan la división nuclear y celular (Cavuoto & Fenech, 2012). Además, el ciclo de la metionina es responsable de proporcionar los grupos metilo necesarios para diversas reacciones de metilación en las células, incluyendo aquellas que tienen un papel esencial en la regulación epigenética.

En el ciclo de la metionina (**Figura 2.43**), el 5-mTHF, obtenido en el ciclo del folato, actúa como donador de un grupo metilo para regenerar la metionina a partir de homocisteína (Hcy, *homocysteine*), que es catalizada por la metionina sintasa (MS, *methionine synthase*) y requiere B12 como cofactor. Posteriormente, la metionina adenosiltransferasa 2A (MAT2A, *methionine adenosyltransferase 2A*) transfiere una adenosina a la metionina para generar S-adenosilmetionina (SAM, *S-adenosylmethionine*), un donante de grupos metilo necesario para múltiples metiltransferasas (MT) específicas en reacciones de metilación de ARN (RMTs), ADN (DNMTs), histonas (HMTs) y proteínas (PRMTs). El cofactor SAM se desmetila durante las reacciones llevadas a cabo por las metiltransferasas para formar S-adenosilhomocisteína (SAH, *S-adenosylhomocysteine*) que luego es hidrolizada por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (AHCY, *S-adenosylhomocysteine hydrolase*) para formar Hcy.

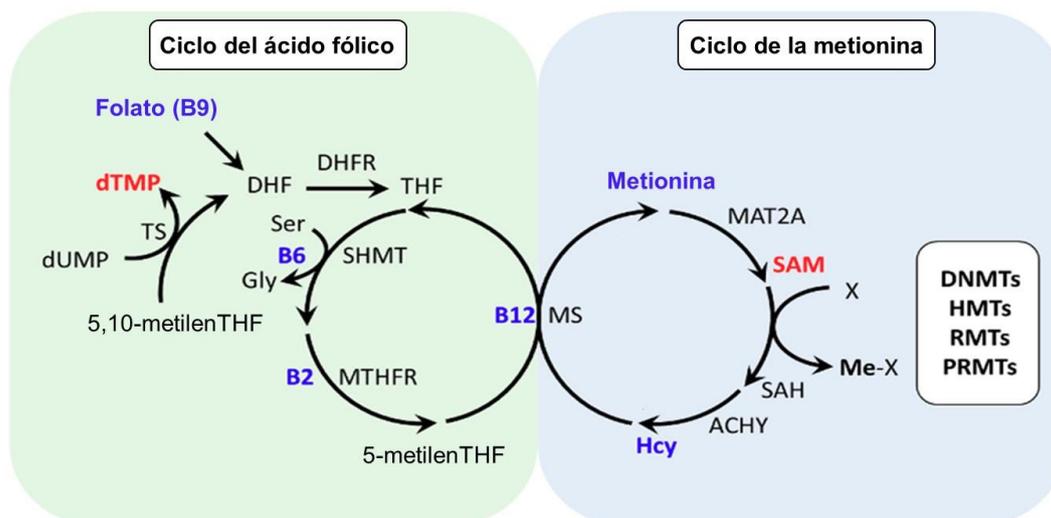


Figura 2.43. Representación esquemática de los ciclos del ácido fólico y de la metionina. AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolasa, B-(2, 6, 9, 12): vitamina tipo B-(2, 6, 9, 12), DHF: 7,8-dihidrofolato, DHFR: enzima dihidrofolato reductasa, DNMTs: metiltransferasas de ADN, dTMP: monofosfato de desoxitimidina, dUMP: monofosfato de desoxiuridina, Hcy: homocisteína, HMTs: metiltransferasas de histonas, MAT2A: metionina adenosiltransferasa 2A, Me: metilo, MS: metionina sintasa, MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa, PRMTs: metiltransferasas de proteínas, RMTs: metiltransferasas de ARN, SAH: S-adenosilhomocisteína, SAM: S-adenosilmetionina, Ser: serina, SHMT: serina hidroximetiltransferasa, THF: 5,6,7,8-tetrahidrofolato, TS: timidilato sintasa. Imagen adaptada de Lyon et al., 2020.

Muchas células cancerosas y tumores primarios dependen en gran medida de la metionina para su crecimiento, mientras que las células normales son relativamente resistentes a la restricción de metionina desde fuentes externas (Cellarier et al., 2003). Esta diferencia de sensibilidad entre las células normales y cancerosas sugiere la posibilidad de que el bloqueo del ciclo de la metionina pueda ser una estrategia terapéutica efectiva y segura. Dado que este ciclo es responsable de proporcionar SAM, necesaria para procesos de metilación en la regulación epigenética y modificaciones postraduccionales de proteínas, el uso de fármacos que regulen directa o indirectamente este ciclo podría influir en el epigenoma celular y la función de diversas proteínas (Sánchez-del-Campo & Rodríguez-López, 2008).

Antifolatos derivados de las catequinas del té

La planta del té (*Camellia sinensis*) es ampliamente conocida por sus propiedades antitumorales y antiinflamatorias (Musial et al., 2020). La mayoría de los efectos fisiológicos descritos han sido, principalmente, asociados a sus catequinas, y en especial aquellas esterificadas con ácido gálico, como la epicatequina galato (ECG, *epicatechin gallate*) y la epigalocatequina galato (EGCG, *epigallocatechin gallate*). Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ésteres galato de las

catequinas aisladas del té verde, como EGCG y el ECG, poseen actividad antifolato, ya que actúan como potentes inhibidores de la enzima DHFR (Navarro-Perán, 2005a; Navarro-Perán, et al., 2005b; Navarro-Perán et al., 2007). Debido a la gran similitud estructural que comparten estas catequinas del té con varios inhibidores de la enzima DHFR, como el metotrexato (MTX, *methotrexate*) y la tetrahydroquinazolina, se evaluó el efecto antiproliferativo de las catequinas en diversas líneas celulares tumorales. Los resultados demostraron que dicho efecto está basado en su actividad antifolato, lo que conlleva la inhibición de la síntesis de ADN, la hipometilación de promotores genéticos (como el p16), y un aumento en los niveles de adenosina, junto con la inhibición de NF- κ B. En conjunto, estos efectos resultan en la parada del ciclo celular y la inducción de la apoptosis (Navarro-Perán et al., 2008).

A pesar de que las catequinas del té muestran una notable actividad contra el crecimiento de tumores, su utilidad en tratamientos terapéuticos se ve restringida por su limitada biodisponibilidad. Las catequinas poseen una estabilidad reducida en entornos con pH neutro o ligeramente alcalino, y, además, no pueden atravesar la membrana plasmática con facilidad. Sin embargo nuestro grupo ha sintetizado moléculas derivadas de estas catequinas con una mejor capacidad de absorción en el organismo y una mayor capacidad para regular la expresión de genes relacionados con el metabolismo de la metionina y la metilación celular (Sánchez-del-Campo et al., 2008; Sánchez-Del-Campo et al., 2009a). Entre estas nuevas moléculas, destacan los epímeros 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-catequina (TMCG) y 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina (TMECG) (**Figura 2.44**). El tratamiento de diferentes líneas tumorales de mama, pulmón, colon y melanoma con estos compuestos demostró una elevada actividad antifolato y antiproliferativa (Sáez-Ayala et al., 2011; Sánchez-del-Campo et al., 2009b).

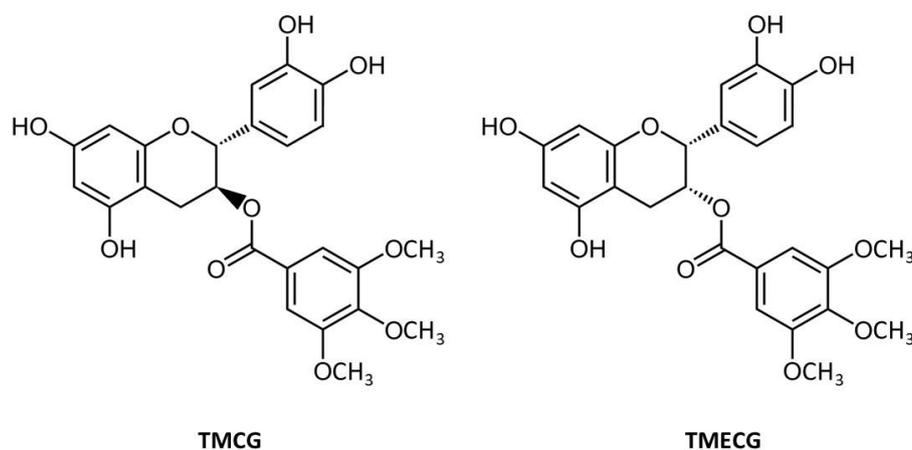


Figura 2.44. Estructura molecular del TMCG y TMECG. TMCG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-catequina, TMECG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina. Imagen adaptada de Sánchez-del-Campo et al., 2008.

La combinación de estos compuestos con otros inhibidores puede generar una estrategia efectiva frente al tratamiento de las células tumorales. Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que el uso de TMECG junto con MTX favorece la diferenciación celular en las células de melanoma. Esto resulta en una mayor expresión de la enzima tirosinasa, que activa de manera eficiente el TMECG, convirtiéndolo en una quinona altamente activa con una capacidad significativa para inducir la apoptosis en las células de melanoma (Sáez-Ayala et al., 2013). Asimismo, se demostró que la combinación de dipiridamol (DIPY) con TMECG o TMCG provoca un efecto sinérgico en la acción antiproliferativa y en la inducción de apoptosis en las células tumorales de mama y melanoma mediante el bloqueo de los ciclos de la metionina y del ácido fólico (Montenegro et al., 2012, 2014, 2015, 2016a; Sánchez-del-Campo & Rodríguez-López, 2008).

El dipiridamol es un fármaco que bloquea la acción de la adenosina desaminasa (ADA, *adenosine deaminase*) y los transportadores de nucleósidos (ENTs, *equilibrative nucleoside transporters*), lo que resulta en un aumento de los niveles de adenosina dentro de las células. Cuando se combina una alta concentración de adenosina intracelular con niveles elevados de homocisteína, debido a la acción del TMCG sobre la DHFR, se produce una acumulación de SAH y la consecuente inhibición efectiva de todas las metiltransferasas dependientes de SAM (**Figura 2.45**).

Así pues, la combinación de TMCG/DIPY, denominada terapia hipometilante o tratamiento HMT, se ha utilizado como una estrategia antitumoral frente a las células de cáncer de páncreas, tal y como se recoge en los resultados de esta Tesis Doctoral.

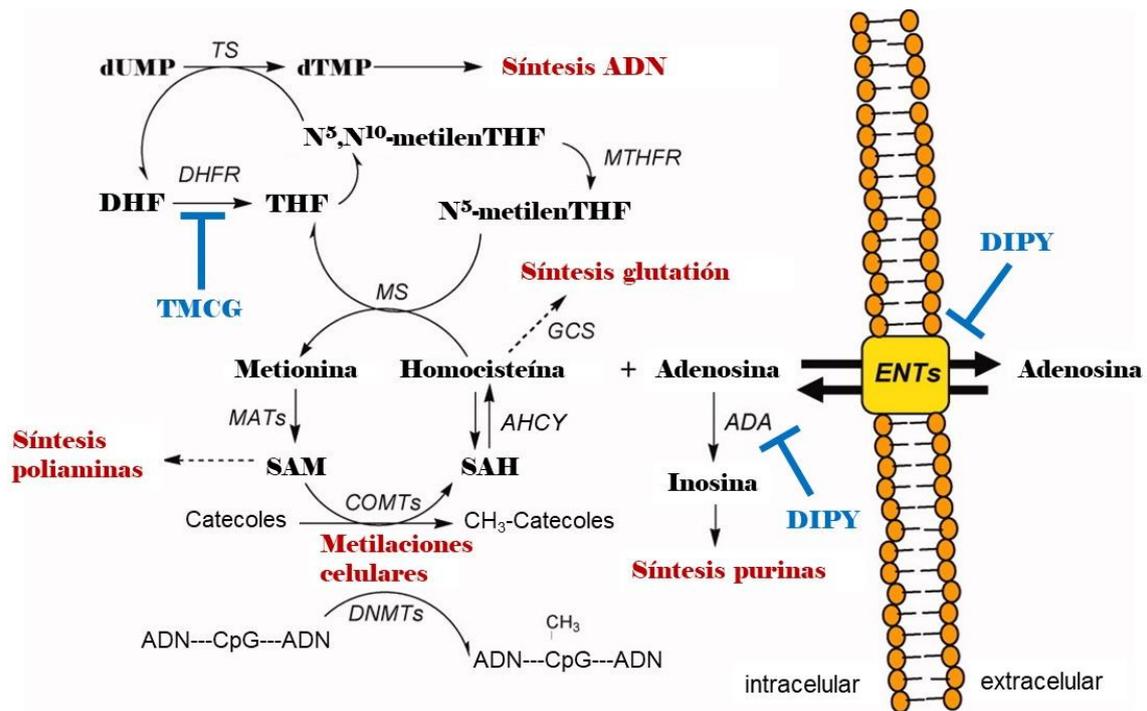


Figura 2.45. El ciclo de la metionina y sus conexiones con diversas rutas metabólicas y de supervivencia celular. ADA: adenosina desaminasa, AHCY: S-adenosilhomocisteína hidrolasa, COMTs: catecol-O-metiltransferasas, DHF: 7,8-dihidrofolato, DHFR: enzima dihidrofolato reductasa, DNMTs: metiltransferasas de ADN, dTMP: monofosfato de desoxitimidina, dUMP: monofosfato de desoxiuridina, ENTs: transportadores de nucleósidos, GCS: gamma-glutamilcisteína sintetasa, DIPY: dipiridamol, MATs: metionina adenosiltransferasas, MS: metionina sintasa, MTHFR: metilenoTHF reductasa, SAH: S-adenosilhomocisteína, SAM: S-adenosilmetionina, THF: 5,6,7,8-tetrahidrofolato, TMCQ: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-catequina, TS: timidilato sintasa. Imagen adaptada de Sánchez-del-Campo & Rodríguez-López, 2008.

Capítulo 3

Objetivos

«No te puedes poner ningún límite, no hay nada imposible»

Usain Bolt

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

El tratamiento del cáncer representa uno de los desafíos más importantes en el ámbito de la salud pública a nivel mundial, y así lo indican sus elevadas tasas de incidencia y mortalidad. Por esta razón, uno de los principales objetivos en el campo de la oncología es diseñar nuevas estrategias terapéuticas que puedan frenar su avance y mejorar tanto la calidad como la esperanza de vida de los pacientes con cáncer. En este sentido, el melanoma y el cáncer de páncreas destacan por su capacidad de metástasis tan agresiva y su resistencia a los tratamientos actuales.

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es conocer los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo, control de la metilación de proteínas y respuesta inmune antitumoral para diseñar nuevas estrategias terapéuticas efectivas frente a melanoma y cáncer de páncreas. Para ello, se han establecido una serie de objetivos específicos:

1. Comprender la relevancia de la respuesta frente al estrés metabólico oxidativo en células de melanoma en condiciones de normoxia.
2. Evaluar los efectos del fármaco acriflavina (inhibidor de HIF-1 α) sobre el metabolismo y progresión del melanoma en condiciones de normoxia.
3. Estudiar el impacto de la modulación de los niveles del factor de transcripción MITF sobre la respuesta inmune antitumoral.
4. Conocer el papel de MITF en el reconocimiento de las células de melanoma por parte del sistema inmunitario.
5. Estudiar la función de la metilación de proteínas en el control del proceso de autofagia en cáncer de páncreas.
6. Evaluar los efectos de una terapia hipometilante como nueva estrategia para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Capítulo 4

Técnicas e instrumentación

«Siempre he creído que si uno se pone a trabajar, los resultados llegarán tarde o temprano»

Michael Jordan

CAPÍTULO 4. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN

4.1. MODELOS EXPERIMENTALES

4.1.1. CULTIVOS CELULARES

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron varias líneas celulares continuas de melanoma humano (501-mel, 501-mel inducible con doxiciclina para MITF, G-361, IGR-37, IGR-37 KO-MITF, SK-MEL-28, SK-MEL-2, A-375 e IGR-39) y de ratón (B16-F10, B16-F10-Luc2, B16-F10-Luc2 KO-MITF y B16-F10-Luc2 KO-ADAM10). También se utilizaron determinadas líneas celulares de tumores de páncreas humanos (PANC-1 y Hs 766T). Las células YAC-1 y HEK-293 fueron empleadas para ensayos de citotoxicidad y luciferasa, respectivamente. El mantenimiento y los ensayos con las líneas celulares se realizaron en la Sección de Cultivo de Tejidos (SCT) de la Universidad de Murcia (UM). La mayoría de estas líneas celulares fueron suministradas por la SCT y obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, *american type culture collection*), salvo la línea B16-F10-Luc2 y las líneas IGR-37 e IGR-39 que fueron obtenidas directamente de la empresa “Caliper Life Sciences” y de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, respectivamente. En el caso de las células YAC-1 fueron cedidas por el Dr. Detlef Schuppan (Instituto de Inmunología Traslacional y Centro de Investigación de Inmunoterapia, Centro Médico Universitario de Mainz, Alemania). De forma rutinaria, se realizaron “autenticaciones” de las líneas celulares en la Sección de Biología Molecular de la UM utilizando un análisis de genotipado, según las directrices de la ATCC.

4.1.1.1. Mantenimiento

El equipamiento necesario para trabajar con cultivos celulares es revisado de manera periódica por la SCT, donde destacan las cabinas de seguridad biológica y química, los microscopios invertidos, los incubadores y los depósitos de nitrógeno líquido. Asimismo, la SCT se encarga del buen estado y de la esterilidad de reactivos, material fungible y medios de cultivos, siendo estos últimos un elemento característico de cada línea celular, ya que se requieren un tipo y una composición determinadas.

Las cabinas empleadas son de seguridad biológica y química (clase II) con flujo laminar vertical, seleccionadas en función del nivel de seguridad requerido por las líneas celulares que se manipularon durante esta Tesis Doctoral. Se utilizaron cabinas de distintas marcas y modelos que cuentan con un flujo laminar vertical para crear un

ambiente estéril en el interior, protegiendo así la muestra. Estas cabinas también tienen filtros y sistemas de flujo de aire que brindan protección tanto al ambiente como al operador. Por otro lado, los incubadores para cultivos celulares son dispositivos que regulan la temperatura, humedad y concentración de CO₂ en su interior. El incubador *Jouan IG650* (Thermo Scientific) se utilizó para cultivos que requieren una concentración de CO₂ del 7.5%, mientras que el incubador *Steri-Cult 3310* (Thermo Scientific) se empleó para aquellos que requieren una concentración de CO₂ del 5%. Ambos incubadores estaban regulados para mantener una temperatura de 37°C, la cual era la temperatura óptima para todas las células empleadas en esta Tesis Doctoral. Para el almacenamiento de líneas celulares mediante criopreservación se usaron los depósitos de nitrógeno líquido *MVE CryoSystem 4000* de Cyro Solutions y el *Locator 4* de Thermo Scientific (**Figura 4.1**).



Figura 4.1. Cabina de flujo laminar, incubadores y depósito de nitrógeno líquido (de izquierda a derecha). Imágenes tomadas en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

Para mantener los cultivos celulares, se utilizaron medios comerciales como EMEM (*Eagle's minimum essential medium*), DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) o RPMI (*Roswell park memorial institute*), en función de las necesidades específicas de cada línea celular. Estos medios son ampliamente utilizados y pueden ser adquiridos con o sin suplementos como aminoácidos no esenciales, piruvato y glutamina. En todos los casos se utilizó un medio comercial que no contenía dichos suplementos, los cuales fueron añadidos posteriormente junto con suero bovino fetal (SBF) con el fin de preparar un medio adecuado (al que llamaremos medio completo) para el metabolismo energético de las células cultivadas *in vitro*. Además, con el objetivo de prevenir contaminaciones, se agregó penicilina y estreptomicina a una concentración final de 50-100 UI/ml y 50-100 µg/ml, respectivamente. La composición detallada del medio de cultivo empleado para cada línea celular individual aparece más adelante en esta sección.

Por otra parte, los medios de cultivo empleados se basan en una solución salina equilibrada y tamponada con bicarbonato de sodio. La cantidad de bicarbonato determina la concentración de CO₂ atmosférico necesaria para mantener el pH neutro de los medios de cultivo, por lo que se usan junto con frascos u otras superficies de cultivo ventiladas. Los medios EMEM y RPMI tienen una concentración de bicarbonato de 1.5 g/l y requieren una atmósfera del 5% de CO₂. En cambio, el medio DMEM tiene una concentración de bicarbonato de 3.7 g/l y requiere una atmósfera del 7.5-10% de CO₂. Todos comparten la necesidad de una atmósfera con un 95% de humedad.

A continuación, se describen las condiciones de cultivo necesarias para cada una de las líneas celulares utilizadas, así como su origen y sus características más relevantes:

501-mel

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

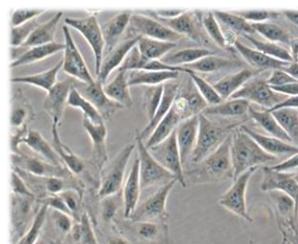
Morfología: Poligonal-fusiforame.

Origen: Melanoma metastásico.

Edad: No se especifica. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



G-361

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

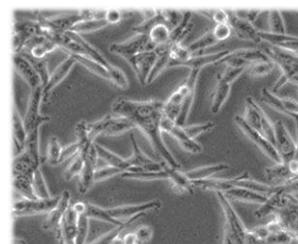
Morfología: Fusiforme.

Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 31 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 34 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



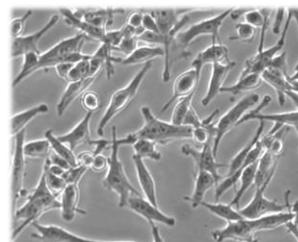
IGR-37

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Fusiforme.

Origen: Nódulo linfático, melanoma maligno.



Edad: 26 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 60 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).

SK-MEL-28

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

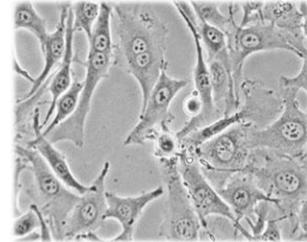
Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 51 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 40 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



SK-MEL-2

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

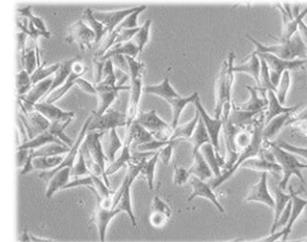
Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 60 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 56 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



A-375

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

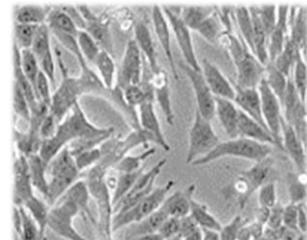
Morfología: Poligonal-fusiforme.

Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 54 años. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



IGR-39

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

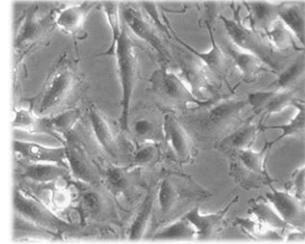
Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma maligno.

Edad: 26 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 30 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).

**B16-F10**

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

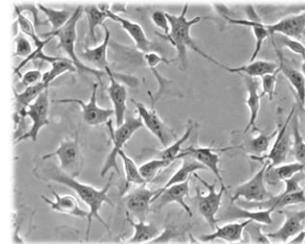
Cepa: C57BL/6.

Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma.

Tiempo de duplicación: ~ 18 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).

**B16-F10-Luc2**

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

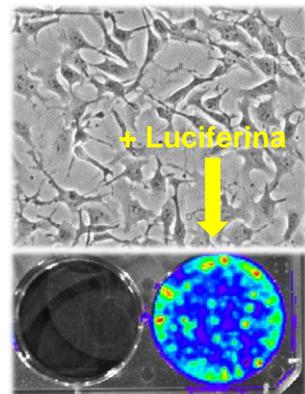
Cepa: C57BL/6.

Morfología: Poligonal.

Origen: Piel, melanoma.

Tiempo de duplicación: ~ 18 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).

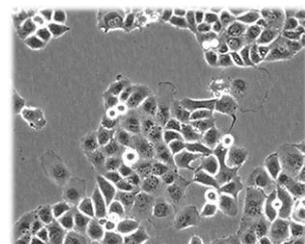
**PANC-1**

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

Morfología: Redondeada.

Origen: Conducto de páncreas, carcinoma epitelioide.



Edad: 56 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 32 horas.

Medio de cultivo: DMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).

Hs 766T

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

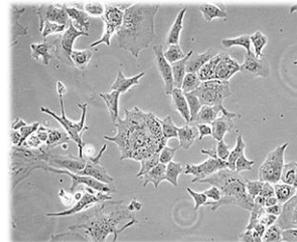
Morfología: Pleomórfica.

Origen: Nódulo linfático, carcinoma pancreático metastásico.

Edad: 64 años. Sexo: Masculino.

Tiempo de duplicación: ~ 48 horas.

Medio de cultivo: DMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



YAC-1

Tipo de crecimiento: Suspensión.

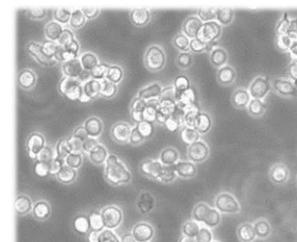
Organismo: *Mus musculus* (Ratón).

Morfología: Redondeada.

Origen: Linfoma.

Tiempo de duplicación: ~ 20 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



HEK-293

Tipo de crecimiento: Adherente.

Organismo: *Homo sapiens* (Humano).

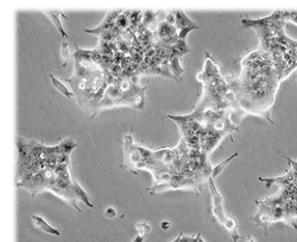
Morfología: Poligonal, formando islas.

Origen: Riñón, embrión.

Edad: Feto. Sexo: Femenino.

Tiempo de duplicación: ~ 30 horas.

Medio de cultivo: EMEM + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + 1% aminoácidos no esenciales (v/v) + 1% de penicilina-estreptomicina (v/v) + 10% SBF (v/v).



Además, las líneas celulares obtenidas y/o empleadas en esta Tesis Doctoral, como 501-mel inducible con doxiciclina para MITF, IGR-37 KO-MITF, B16-F10-Luc2 KO-MITF

y B16-F10-Luc2 KO-ADAM10, comparten las mismas condiciones de cultivo que sus líneas parentales.

Para trabajar con líneas celulares es necesario conocer sus fases de crecimiento. Para ello, se realizan representaciones gráficas de crecimiento que muestran la correlación entre la cantidad de células sembradas por área y el tiempo de cada fase (**Figura 4.2**). En general, se pueden distinguir tres etapas:

- Fase lag: se distingue por la ausencia de crecimiento o un crecimiento extremadamente lento, donde las células se están recuperando del estrés del subcultivo, reorganizando su citoesqueleto y segregando matriz extracelular con el fin de adherirse a la superficie de cultivo.
- Fase log o exponencial: en esta etapa, la expansión del cultivo es exponencial y las células muestran un tiempo de duplicación propio de cada tipo celular. Esta fase continúa hasta que las células alcanzan la confluencia, es decir, ocupan completamente la superficie de cultivo en el caso de células adherentes.
- Fase estacionaria: en esta fase, el crecimiento se paraliza o ralentiza mucho debido a la falta de espacio y/o nutrientes. Las células están confluentes. Si las células no se subcultivan y se reemplaza el medio de cultivo por medio nuevo, empieza a disminuir la viabilidad y el cultivo entra en la fase de declive.

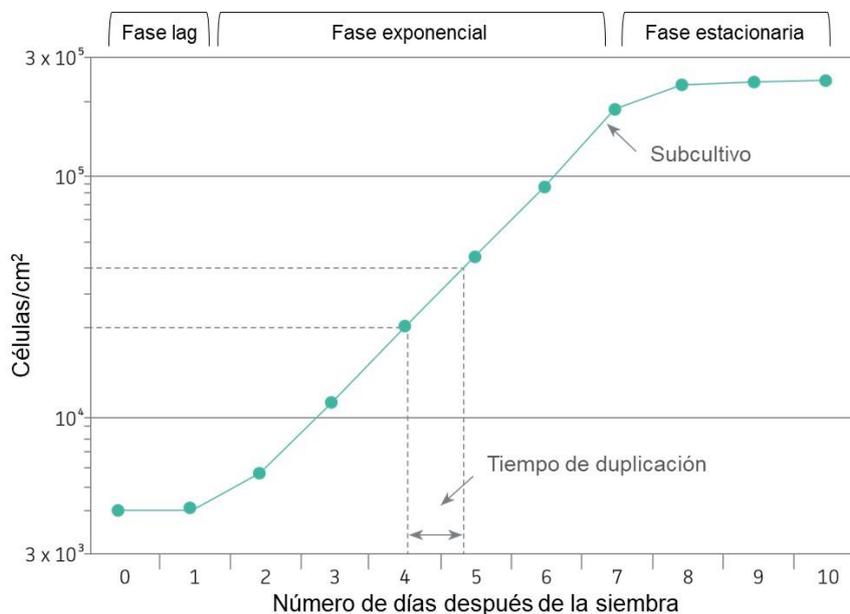


Figura 4.2. Curva de crecimiento teórica para una línea celular continua. Imagen traducida de la guía para cultivo de células animales de la ATCC.

Es de vital importancia mantener continuamente los cultivos en fase exponencial, sin llegar a la fase estacionaria, con el fin de asegurar su viabilidad y su estabilidad genética

y fenotípica. En este sentido, debemos realizar tanto los experimentos como el subcultivo y la criopreservación durante la fase exponencial, evitando siempre que las células alcancen el 100% de confluencia.

4.1.1.2. Subcultivo

La mayoría de las líneas celulares utilizadas en esta Tesis Doctoral son del tipo adherente, lo que significa que crecen sujetas a la superficie de los recipientes de cultivo. Cuando las células se expanden y cubren la mayor parte de la superficie del recipiente, es necesario despegarlas (tanto entre sí como del soporte) y transferir una pequeña cantidad a un nuevo recipiente para que puedan seguir creciendo en fase exponencial. Este proceso se conoce como subcultivo o "pase". Se recomienda llevar a cabo el subcultivo cuando las células alcanzan una confluencia del 80-90%. Para la disgregación de las células se puede utilizar una técnica mecánica con un raspador, pero más frecuentemente se utiliza una disolución tamponada de tripsina y EDTA.

Se llevó a cabo el subcultivo de células cultivadas en frascos de 75 cm² cuando éstas habían alcanzado una confluencia del 80-90%. Para ello, se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con 1 ml de tripsina. A continuación, se añadieron 2 ml de tripsina y se incubó el frasco a 37°C hasta que la monocapa de células se dispersó. La reacción de tripsinización se detuvo agregando 8 ml de medio completo y se centrifugó todo el volumen de suspensión celular. Se resuspendió el precipitado resultante en 2 ml de medio completo y se tiñó una alícuota de la suspensión con azul tripán. Así, se determinó la viabilidad celular y se añadió una cantidad adecuada de células a un nuevo frasco de cultivo con 10 ml de medio fresco completo. En cambio, para el subcultivo de las células en suspensión (YAC-1) simplemente se añadía un volumen adecuado de suspensión celular a un nuevo frasco de 75 cm² con medio fresco completo.

4.1.1.3. Crioconservación

Para la congelación y almacenamiento de las células utilizadas en esta Tesis Doctoral, se utilizó el medio de cultivo correspondiente suplementado con 5% DMSO y 10% SBF. En cada caso, se agregaron a un criotubo 850 µl de una suspensión celular que contenía aproximadamente 1500000 de células en medio completo. Luego, se añadieron 100 µl de SBF y 50 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO funciona como un agente crioprotector, previniendo la formación de cristales de agua que puedan dañar la estructura celular. Los criotubos se colocaron en un recipiente específico, el cual permite la reducción constante de temperatura de 1°C por minuto, para una adecuada congelación de las células y su posterior almacenamiento en un congelador específico

a -80°C . Una vez que las células estuvieron congeladas, el personal de la SCT transfirió los criotubos a los depósitos de nitrógeno líquido mencionados anteriormente (-196°C), donde pueden permanecer viables durante años. Finalmente, la ubicación e identificación de los viales se quedó registrada en un programa de gestión.

4.1.1.4. Tratamientos

Para realizar los diferentes tratamientos, las células se sembraron a una densidad que garantizara su crecimiento exponencial durante los días de tratamiento. Los ensayos más recurrentes fueron los tratamientos de las células con acriflavina y con TMCG y dipiridamol (DIPY). La acriflavina es un inhibidor de la dimerización HIF-1, mientras que la combinación de TMCG y DIPY configura un tratamiento que disminuye el nivel de metilación celular, de ahí que se denomine HMT (tratamiento hipometilante).

En ocasiones, las células han sido tratadas con el compuesto MG132 para inhibir el proteasoma, CoCl_2 para simular condiciones de hipoxia, baja concentración de glutamina para imitar condiciones de baja cantidad de nutrientes y compuestos como salubrinal, rapamicina, AdOx, MTX, U0126, wortmanina, etc., con el fin de inducir otros tipos de estrés.

La irradiación fue otro tratamiento empleado con frecuencia sobre las células. Se utilizó el irradiador de rayos X *Andrex SMART 200E* (YXLON International) de la Sección de Radioprotección y Residuos de la UM, con las condiciones de 200 kV, 4.5 mA, con una distancia foco-objeto de 20 cm y una dosis de 2.5 Gy/minuto (**Figura 4.3**). En cada caso, se aplicó la dosis necesaria.



Figura 4.3. Irradiador de rayos X *Andrex SMART 200E* de YXLON International. Imagen tomada en la Sección de Radioprotección y Residuos de la UM.

4.1.2. MODELOS ANIMALES

En el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia se llevaron a cabo ensayos con animales cumpliendo con la Directiva Europea 2010/63/CE del 22 de septiembre, que establece la protección de los animales utilizados en fines científicos, así como con el Real Decreto 53/2013 del 1 de febrero, que establece los principios fundamentales que se aplican para proteger a los animales utilizados en experimentación y otros propósitos científicos, incluyendo la enseñanza. Estas normativas abordan aspectos relacionados con el bienestar animal, la clasificación de procedimientos según su grado de severidad, los criterios de capacitación del personal investigador y la aplicación del principio de las Tres Erres de Russell y Burch (Lewis, 2019), que busca reemplazar, reducir y refinar el uso de animales en investigación.

Para realizar los ensayos con animales es necesario elaborar previamente un Plan de Investigación que detalle los procedimientos a realizar con los animales para que sea evaluado y aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la UM. Además, es indispensable obtener la autorización expresa de la autoridad competente, en este caso, la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia.

4.1.2.1. El ratón como modelo animal

Los modelos animales son herramientas importantes para comprender la patogénesis de diversas enfermedades y pueden ser de gran ayuda en el desarrollo de nuevas terapias. El ratón (*Mus musculus*) se destaca entre otros organismos modelo debido a varias ventajas que ofrece, como su tamaño relativamente pequeño, su similitud genética y fisiológica con los humanos, su condición de mamífero, su corto tiempo de generación, su amplio estudio genético (incluyendo la secuenciación completa de su genoma en 2002) y la disponibilidad de líneas genéticamente definidas y líneas con mutaciones genéticas específicas.

En investigación, los ratones utilizados provienen de cepas o líneas consanguíneas. Las líneas consanguíneas, obtenidas a través del entrecruzamiento de un macho y una hembra de la misma camada durante más de 20 generaciones, dan lugar a individuos que son prácticamente idénticos desde un punto de vista genético (isogénicos), homocigotos para la mayoría de sus genes y uniformes en cuanto a fenotipo. Estas líneas son muy valiosas en la investigación, ya que permiten llevar a cabo ensayos eliminando los posibles efectos atribuibles a la variabilidad genética entre individuos (Benavides & Guénet, 2003). En esta Tesis Doctoral se utilizaron ratones C57BL/6, Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu y Rag2-Il2rg doble *knockout* (**Figura 4.4**).



Figura 4.4. Ratones C57BL/6, Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu y Rag2-Il2rg doble *knockout* (de izquierda a derecha). Imágenes obtenidas de The Jackson Laboratories y Envigo RMS.

Ratones C57BL/6

La cepa de ratón consanguínea C57BL/6 se utiliza ampliamente en investigación como un modelo para enfermedades y para generar ratones con modificaciones genéticas debido a sus numerosas ventajas. Esta cepa se aplica en diversas áreas de investigación, como biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, genética, inmunología, neurobiología y oncología, entre otras. En general, los ratones C57BL/6 son fáciles de reproducir, tienen una larga esperanza de vida y una baja susceptibilidad a los tumores.

Ratones Hsd:Athymic Nude-Foxn1nu

La mutación homocigota en el locus *nude* (*nu/nu*) se encuentra en varias cepas de ratones y es una mutación recesiva. Los ratones con esta mutación tienen ambos alelos del gen *FOXP1* mutados, el cual codifica la proteína Forkhead box protein N1. La expresión de *FOXP1* solo ocurre en piel y timo, por lo que la mutación *nu/nu* afecta a estos dos órganos. En la piel, causa problemas en el folículo piloso que resultan en la pérdida del pelo en los ratones. En el timo, la mutación *nu/nu* provoca una defectuosa maduración y diferenciación del estroma. Así pues, el timo de estos ratones es pequeño, quístico y no puede llevar a cabo una adecuada maduración de los linfocitos T. En este sentido, estos ratones se denominan como "atímicos" y se caracterizan por tener un número bajo de linfocitos T funcionales.

Ratones Rag2-Il2rg doble *knockout* (R2G2)

El modelo R2G2 es un ratón con un fenotipo ultra inmunodeficiente. Este modelo contiene mutaciones en los genes *RAG* (gen activador de recombinación) e *IL2RG* (gen la subunidad gamma del receptor de interleucina-2). En consecuencia, estos ratones se caracterizan por la falta de receptores funcionales para IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15, ausencia de células NK, deficiencia de linfocitos T y B, así como una disminución de células dendríticas, macrófagos y neutrófilos.

4.1.2.2. Mantenimiento de los ratones

Se emplearon ratones hembra C57BL/6 o atímicos de entre 4 y 6 semanas de edad, con un peso de 20-24 g, suministrados por Envigo RMS para llevar a cabo los diferentes ensayos. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, y su dieta consistió en pellets para roedores Harlan teklad 8604. Los ensayos comenzaron al menos dos semanas después de su llegada al animalario, una vez que los animales estaban aclimatados y habían cumplido con la cuarentena correspondiente. Para mantener condiciones asépticas, se utilizaron jaulas que aseguraban el aislamiento microbiológico en una habitación con presión de aire positiva. Además, los procedimientos que implicaban manipulación del animal se realizaron en cabinas de flujo laminar.

4.1.2.3. Estudio de tumores primarios y metástasis

Para recrear el desarrollo de un tumor primario en la piel, se inyectaron 5×10^5 de células de melanoma debajo de la piel del flanco dorsal del animal. La implantación subcutánea es sencilla de realizar, de bajo coste y permite una observación más fácil del desarrollo del tumor, por lo que sigue siendo ampliamente utilizada.

Por otro lado, se inyectaron el mismo número de células de melanoma (5×10^5) en la vena de la cola del ratón para estudiar la capacidad de colonización (última fase de metástasis) principalmente en pulmón, pero también en otros órganos. Primero se dilató durante unos minutos la vena de la cola del animal utilizando una lámpara de calor de luz roja o agua caliente y posteriormente se introdujeron las células, en un volumen de 100 μ l de PBS estéril, utilizando una aguja de diámetro 30G x 1/2" (13 x 0.3 mm). Para realizar este procedimiento se usó un sistema de inmovilización del ratón (**Figura 4.5**).

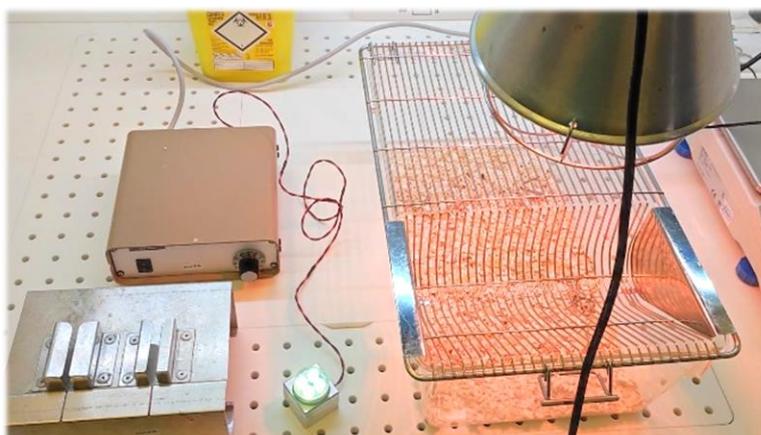


Figura 4.5. Equipo necesario para inmovilizar al ratón y dilatar la vena de su cola. Imagen tomada durante mi estancia en el centro de investigación Domus Medica tilbygg (Oslo, Noruega).

4.1.2.4. Monitorización de tumores primarios y metástasis

Las células B16-F10-Luc2 utilizadas tienen la gran ventaja de producir la proteína luciferasa. De esta forma, cuando se les suministra el sustrato de la luciferasa, la luciferina, las células emiten luz, lo que se conoce como bioluminiscencia. Para visualizar los tumores primarios y las metástasis en ratones, se administró luciferina de luciérnaga (Caliper Life Sciences) a una dosis de 120 mg/kg por vía intraperitoneal y se utilizó el sistema de imagen *in vivo* (IVIS, *in vivo imaging system*) de Caliper Life Sciences (**Figura 4.6**). Este sistema codifica la intensidad de la luz detectada mediante un código de colores, en el que el azul representa una baja intensidad de señal y el rojo una alta intensidad de señal. La luz emitida por este proceso de bioluminiscencia se mide en unidades de fotones por segundo por centímetro cuadrado por estereorradián (ph/s/cm²/sr).

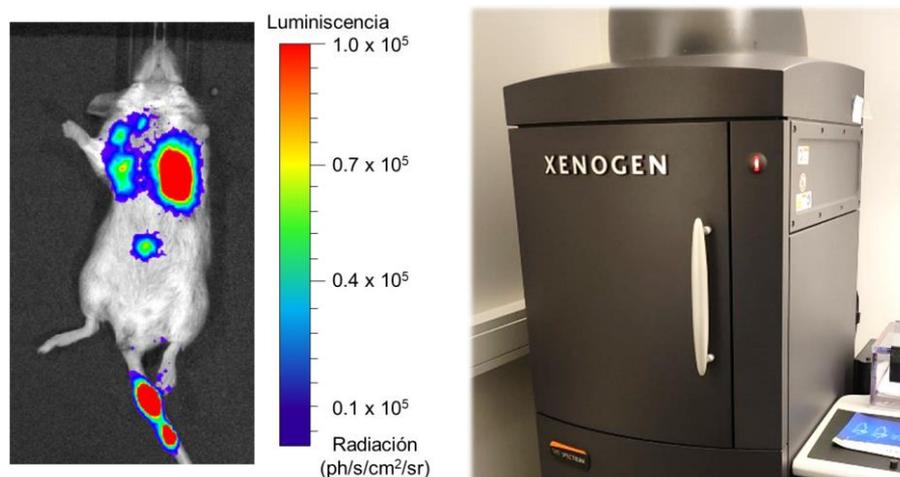


Figura 4.6. Imagen obtenida de un ratón con metástasis (izquierda) y sistema de imagen *in vivo* (IVIS) de Caliper Life Sciences (derecha). La escala de color indica la intensidad de luminiscencia. Imágenes tomadas durante mi estancia en el centro de investigación Domus Medica tilbygg (Oslo, Noruega).

Además, para controlar el desarrollo de los tumores primarios también se hicieron medidas periódicas del área tumoral utilizando un calibre. Debido a la dificultad de medir la altura del tumor, es ampliamente aceptado el uso de la siguiente fórmula para calcular el volumen del tumor (Kersemans et al., 2013):

$$\text{Volumen del tumor} = \frac{1}{2} \times (\text{longitud} \times \text{ancho}^2)$$

No obstante, en los experimentos con ratones, se deben descartar a aquellos que presenten anomalías en su tamaño, peso o síntomas de enfermedades. Así, se excluyeron los animales que no mostraron un crecimiento tumoral en el día 12 después de la implantación o cuyos tumores superaron los 8 mm de diámetro en el día 8.

4.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

4.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

4.2.1.1. Tinción con azul tripán

El azul tripán es un colorante vital que se utiliza para distinguir entre células vivas y muertas. Este colorante no puede penetrar en las células que tienen una membrana plasmática intacta y solo puede teñir aquellas células que tienen una membrana dañada. Para la tinción con azul tripán, se mezcló el mismo volumen de suspensión celular que de azul tripán al 0.4%, dando lugar a una proporción 1:1. Después de homogeneizar la mezcla, se cargó en el hemocitómetro y se contó el número de células vivas y muertas utilizando un contador manual. Es posible utilizar diferentes diluciones de la suspensión celular, pero teniendo en cuenta siempre el factor de dilución correspondiente.

El hemocitómetro o cámara de Neubauer es un portaobjetos diseñado específicamente para la cuantificación de células. Su superficie está impresa con una retícula compuesta por 9 cuadrados de 1 mm² cada uno. En las esquinas de esta retícula se encuentran 4 cuadrados que se dividen en 16 cuadrados más pequeños, de 0.0625 mm² cada uno. La profundidad de la cámara es fija, lo que permite la medición precisa del volumen y la cuantificación de células (**Figura 4.7**).



Figura 4.7. Imagen y esquema de una cámara de Neubauer. Se muestra una ampliación de la retícula cuadrangular con los cuadrantes donde se realiza el recuento celular señalados en rojo.

Los cálculos que se realizaron para conocer el número de células vivas, de células muertas y de células totales por mililitro de la suspensión celular fueron:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células viables/ml} = \text{Promedio de células viables por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ células muertas/ml} = \text{Promedio de células muertas por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ células totales/ml} = \text{Promedio de células totales por cuadro} \times 10000 \times \text{FD} \times 2$$

En estas ecuaciones, el número promedio de células por cuadro se multiplica por 10000 para obtener el número de células por ml, ya que cada una de las 9 cuadrículas en la cámara de Neubauer contiene un volumen de 0.1 mm^3 ($0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm}$). FD (factor de dilución) indica la cantidad de veces que se diluye la suspensión celular antes de mezclarla con el tripán, mientras que el 2 hace referencia a la dilución de la muestra con el azul tripán.

Para obtener la viabilidad de la suspensión celular, se aplica la siguiente fórmula una vez se ha obtenido el número de células vivas y muertas:

$$\% \text{ viabilidad} = \frac{\text{Promedio de células viables por cuadro}}{\text{Promedio de células totales por cuadro}} \times 100$$

4.2.1.2. Ensayo con MTT

El ensayo de MTT es una técnica colorimétrica sensible y cuantitativa utilizada para evaluar la viabilidad y proliferación celular. Se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa para transformar un sustrato conocido como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), soluble en agua y de color amarillo en un producto de color violeta, llamado formazano, que genera cristales insolubles en agua (**Figura 4.8**).

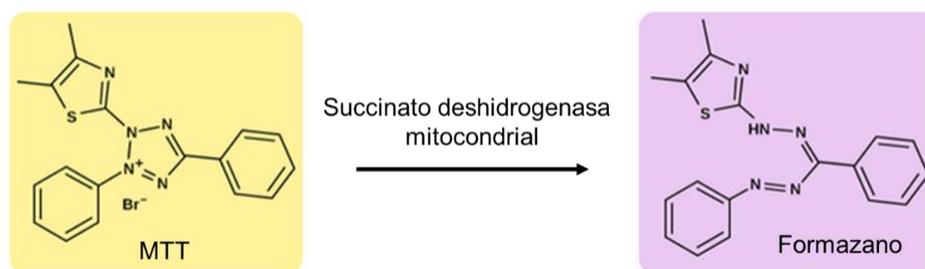


Figura 4.8. Reacción de la conversión de MTT a Formazano. Reacción llevada a cabo por la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial. MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio.

Esta técnica, así como algunas de sus variantes, son ampliamente utilizadas para diversas aplicaciones en estudios celulares. Entre ellas, encontramos la cuantificación del crecimiento y la viabilidad celular, la medición de la proliferación celular en respuesta a factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes, la medición de la citotoxicidad y evaluación de citotóxicos e inhibidores del crecimiento. Además, una ventaja que presenta este método es su capacidad para procesar rápidamente una gran cantidad de muestras al realizarse en placas de 96 pocillos.

Para llevar a cabo el ensayo MTT, se sembraron las células de interés en placas de 96 pocillos y se realizó el tratamiento elegido. Para efectuar su procesamiento, se

sustituyó el medio de los pocillos por 200 µl de medio completo fresco y se agregaron 50 µl de una solución de MTT a una concentración de 5 mg/ml en medio de cultivo, lo que da una concentración final de MTT de 1 mg/ml en cada pocillo. Luego, las células se incubaron en oscuridad durante 2-4 horas a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiró el medio que contiene la solución de MTT y se añadieron 100 µl de DMSO para lisar las células y solubilizar el formazano generado por la metabolización del MTT. Después, se agitó la placa para disolver los cristales de formazano y obtener una distribución uniforme del color en el pocillo. Finalmente, se midió la absorbancia a 570 y 690 nm utilizando un lector de placas *FLUOstar Omega* (BMG Labtech) presente en la SCT de la UM. Para minimizar el ruido de fondo que podía aportar el material plástico de la placa, se restó la absorbancia a 690 nm del valor de absorbancia del formazano a 570 nm.

Además, para evaluar el efecto sobre la viabilidad celular con una droga determinada, se representaron los datos como "porcentaje de absorbancia en comparación con el control" en el eje de ordenadas y la "concentración del fármaco" en el eje abscisas, obteniendo así curvas de inhibición que permitían calcular el valor de la IC50. Este valor determina la concentración que inhibe el crecimiento o reduce la viabilidad celular en un 50% en comparación con el control no tratado.

4.2.1.3. Tinción de cristal violeta

El ensayo de cristal violeta es una técnica rápida y sencilla que se utiliza para realizar una cuantificación indirecta de células y obtener información sobre su densidad relativa en cultivo. En este ensayo, el colorante cristal violeta se utiliza para teñir las células de violeta, ya que se une tanto al ADN como a las proteínas presentes en las células, permitiendo así su visualización y cuantificación.

Para realizar esta tinción celular, las células se cultivaron en placas de 24 pocillos. Primero las células se lavaron con 500 µl de PBS y después se fijaron con 200 µl metanol al 100% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto se preparó una dilución de la solución cristal violeta (Sigma) al 0.5% en metanol 100%. Una vez fijadas, las células se lavaron dos veces con agua destilada y se incubaron con 200 µl de la solución de cristal violeta al 0.5% durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las células fueron lavadas con agua destilada tres veces para eliminar el exceso de colorante. Se dejó secar la placa durante un día para visualizar la densidad celular de cada pocillo. Finalmente, para cuantificar esa densidad celular, se añadieron 150 µl de DMSO a cada pocillo, se incubó durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente y se determinó el valor de absorbancia a 595 nm.

4.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS

4.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA

En la apoptosis, los fragmentos de ADN resultantes se conocen como fragmentos de bajo peso molecular o LMW (*low molecular weight*), en contraste con el ADN de alto peso molecular o HMW (*high molecular weight*) que se encuentra en células no apoptóticas y corresponde a material genético no fragmentado.

El kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche), ELISA tipo “sándwich”, permite detectar los fragmentos LMW unidos a histonas en los mono- y oligonucleosomas. El kit utiliza un anticuerpo biotilado anti-histona que reconoce las formas H1, H2A, H2B, H3 y H4, así como un anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-ADN (**Figura 4.9**). El anticuerpo biotilado se une a las moléculas de estreptavidina que recubren la base de los pocillos de la placa, y a través de la porción IgG se une a las histonas, inmovilizando los nucleosomas. La actividad peroxidasa se determina espectrofotométricamente y es proporcional a la cantidad de mono- y oligonucleosomas inmovilizados. Los lisados de células no apoptóticas tendrán pocos mono- y oligonucleosomas, lo que dará lugar a una señal de peroxidasa baja. Por otro lado, los lisados de células apoptóticas estarán enriquecidos en estas formas y darán lugar a una señal más elevada.

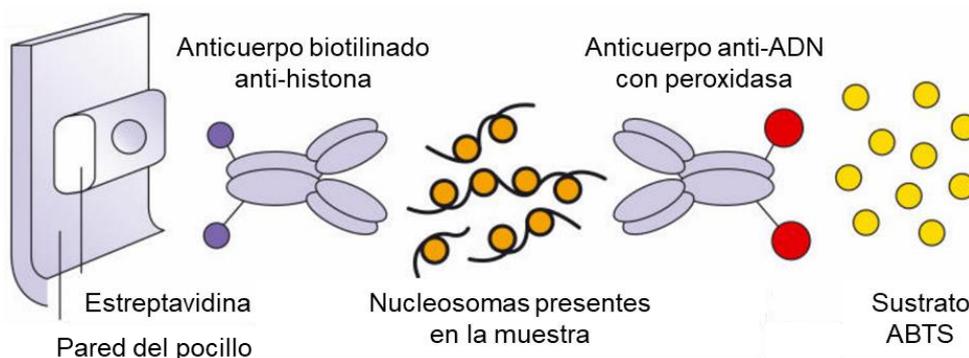


Figura 4.9. Esquema de los principales elementos del kit empleado para la detección de apoptosis mediante ELISA. ABTS: 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-sulfónico). Imagen traducida del protocolo del kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche).

Para este ensayo, las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos y expuestas a los tratamientos de interés. En el día del procesamiento, se retiró el medio de los pocillos y se agregó 200 μ l de tampón de lisis, que se dejó incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este tampón rompe la membrana plasmática pero no la nuclear, lo que permite la liberación del ADN fragmentado presente solo en el citoplasma de las células apoptóticas, pero no del ADN que se encuentra en los núcleos intactos de las células normales. Luego, la placa se centrifugó a 200 \times g durante 10 minutos.

Se añadieron 20 µl del sobrenadante a cada pocillo de una nueva placa de 96 pocillos, junto con 80 µl del tampón de incubación que contenía anticuerpos anti-histona y anti-ADN. La mezcla se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Después de este tiempo, se realizaron tres lavados con el tampón de incubación para quitar los anticuerpos no unidos y los restos del lisado celular. Finalmente, se agregaron 100 µl de una disolución tamponada de ABTS (2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-sulfónico)), el sustrato de la peroxidasa, y se realizaron lecturas de absorbancia a 415 nm cada 5 minutos durante 40-45 minutos.

Para analizar los resultados, se elaboró una gráfica con los valores de absorbancia en el eje de ordenadas y el tiempo en el eje de abscisas. Se obtuvo la pendiente de cada recta y se calculó el factor de enriquecimiento citosólico nucleosomal (FECN). Este factor se calcula dividiendo la pendiente de la recta de cada muestra entre la pendiente de la recta del control y normalizando además estos valores respecto a la cantidad inicial de células lisadas. Para ello, se realizó un ensayo de MTT en paralelo. En definitiva, el cálculo del FECN se realiza de la siguiente manera:

$$FECN = \frac{\left(\frac{\text{valor de la pendiente de la recta de apoptosis}}{\text{valor de absorbancia del MTT}} \right)}{\left(\frac{\text{valor de la pendiente de la recta de apoptosis control}}{\text{valor de absorbancia del MTT control}} \right)}$$

4.2.2.2. Ensayo TUNEL

Otra forma de detectar células apoptóticas es mediante el ensayo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling*), que permite detectar las roturas del ADN formadas en la última fase de la apoptosis. Este método se basa en la capacidad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal para marcar con una etiqueta fluorescente los extremos 3' de las roturas del ADN.

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó el kit *In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein* (Roche) en células adherentes sembradas en placas de 96 pocillos. Tras realizar los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS y fueron fijadas con paraformaldehído 4% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se lavaron con PBS, se añadieron 100 µl de la solución de permeabilización (0.1% Triton-X100 en 0.1% de citrato sódico) y se incubaron durante 2 minutos en hielo. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS y se dejó secar la placa durante 15 minutos a temperatura ambiente. En ese tiempo, se preparó la mezcla de tinción, formada por la enzima y nucleótidos marcados con fluoresceína, siguiendo el protocolo. Una vez que estaban secos los pocillos con las células, se añadieron 50 µl de la mezcla

de tinción a cada pocillo y se dejó incubar 1 hora a 37°C en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, las células fueron lavadas dos veces con PBS para eliminar el exceso de la mezcla de tinción y se incubaron con 100 µl de DAPI a una concentración final de 1 mg/ml en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con PBS para quitar el DAPI no incorporado y se analizaron utilizando el microscopio de fluorescencia.

4.2.3. MICROSCOPIA

4.2.3.1. Microscopía óptica

El funcionamiento de un microscopio óptico consiste en el uso de un haz de luz (fotones), que incide en la muestra a observar, y en un conjunto de lentes que generan una imagen aumentada de la muestra. En general, los microscopios actuales suelen ser compuestos, lo que significa que tienen varias lentes. Con ellos, se pueden aumentar las imágenes hasta 2000 veces y su poder de resolución es de 0.2 µm, lo que supone una resolución mil veces superior a la del ojo humano.

En esta Tesis Doctoral se emplearon varios tipos de microscopios para distintas aplicaciones. Para el mantenimiento y tratamiento de los cultivos celulares (observación de la morfología, confluencia, etc.) se utilizó un microscopio óptico invertido. El conteo de células, mediante tinción con azul tripán, se llevó a cabo en un microscopio óptico convencional. Para la visualización de muestras de inmunofluorescencia, se usó un microscopio confocal.

Microscopía óptica de contraste de fases

La visualización de células en cultivo se llevó a cabo utilizando microscopios ópticos invertidos, utilizando principalmente el método de contraste de fases. En un microscopio invertido, el revólver con los objetivos se ubica debajo de la platina donde se coloca la muestra, mientras que el haz de luz y el condensador se encuentran sobre ella. Esta configuración permite visualizar células contenidas en diversos recipientes (frascos, placas, etc.) sin que el ancho o el volumen de los mismos sean un problema y sin necesidad de un montaje o preparación previa de las muestras. El contraste de fases resulta ideal para visualizar muestras delgadas no teñidas, como los cultivos celulares. En este método se utilizan diferentes moduladores ópticos, como anillos y diafragmas, que producen variaciones en el índice de refracción de los distintos componentes celulares. Esto genera un aumento en el contraste que percibimos, donde las partes celulares más densas aparecen más oscuras que las partes celulares menos densas.

Microscopía de fluorescencia

En la Sección de Cultivos de Tejidos de la UM se encuentran disponibles dos microscopios ópticos invertidos que poseen un módulo de fluorescencia (**Figura 4.10**). Asimismo, poseen un módulo de fotografía para tomar imágenes de las diferentes muestras. El módulo de fluorescencia incluye una fuente de luz, un filtro de excitación y un espejo dicróico que solo permite pasar la luz de una longitud de onda determinada.

A diferencia de la microscopía óptica de campo claro o contraste de fases, la microscopía de fluorescencia permite la identificación de la distribución de moléculas individuales a través de su capacidad para emitir fluorescencia. Esto confiere a la microscopía de fluorescencia la capacidad del estudio de la localización de proteínas intracelulares marcadas con fluorescencia. Asimismo, esta técnica fue utilizada para hacer un seguimiento de la generación de las líneas celulares mediante CRISPR/Cas9.



Figura 4.10. Microscopios ópticos invertidos *Nikon-Eclipse TE-2000U* (a la izquierda) y *Zeiss Axio Observer 7* (a la derecha). Ambos microscopios están acoplados a un módulo de fluorescencia y fotografía. Imágenes tomadas en la Sección de Cultivos de Tejidos de la UM.

Microscopía confocal

La microscopía confocal representa una mejora significativa respecto a las técnicas clásicas de microscopía óptica. La microscopía confocal permite obtener imágenes con mayor definición y contraste, así como secciones ópticas de distintos planos de la muestra dando lugar a la reconstrucción de imágenes tridimensionales.

El fundamento de la microscopía confocal consiste en la eliminación de la luz reflejada que proviene de planos fuera de foco. Esto se logra iluminando una pequeña área de la muestra y capturando únicamente el haz de luz que proviene del plano focal, descartando los haces de luz que proceden de planos superiores e inferiores. En primer lugar, la luz de una fuente de iluminación pasa a través de un diafragma, se refleja en

un espejo dicróico y se enfoca en un punto específico de la muestra mediante una lente objetiva. Luego, la señal emitida por el punto iluminado ya sea fluorescencia o luz reflejada, regresa por el mismo camino óptico, atraviesa el espejo dicróico y se enfoca en un detector. Se coloca un segundo diafragma o *pinhole* delante del detector para eliminar las señales fuera de foco. En la microscopía confocal, se utiliza el láser como fuente de luz para iluminar regiones muy pequeñas de la muestra de forma intensa. La muestra completa es iluminada o "barrida" punto por punto, lo que da como resultado una imagen virtual o reconstruida. La luz emitida se recoge punto por punto en el fotomultiplicador, donde la señal analógica se convierte en digital y se muestra en un monitor.

En general, los microscopios suelen disponer de múltiples fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite la recolección de diferentes longitudes de onda en cada uno de ellos. De esta manera, es posible marcar y visualizar simultáneamente distintos componentes o antígenos celulares mediante el uso de fluorocromos.

Las muestras de inmunofluorescencia procesadas durante esta Tesis Doctoral se visualizaron mediante el microscopio de barrido láser confocal *Leica STELLARIS 8* (Leica Microsystems) situado en la Sección de Microscopía (Edificio ACTI) de la UM (**Figura 4.11**). Este equipo incluye un láser diodo CV (405 nm) y destaca por su capacidad de utilizar un láser blanco WLL2 que permite una gran flexibilidad para las características de excitación de diferentes fluorocromos, con un rango de entre 440 y 790 nm. Para el análisis de los resultados se utilizaron los programas informáticos *LAS X Life Science* (Leica Microsystems) e *ImageJ* (National Institute of Health).



Figura 4.11. Microscopio de barrido láser confocal *Leica STELLARIS 8* (Leica Microsystems). Imagen tomada en la Sección de Microscopía de la UM.

4.2.3.2. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica utiliza los mismos principios básicos que la microscopía óptica, pero en lugar de utilizar un haz de fotones, emplea un haz de electrones. Mientras que el poder de resolución de un microscopio óptico se limita a $0.2 \mu\text{m}$ debido a la longitud de onda de la luz, el microscopio electrónico tiene un poder de resolución de 0.2 nm gracias a la longitud de onda más corta de los electrones, lo que permite estudiar la ultraestructura celular con mayor detalle. Existen dos tipos principales de microscopía electrónica, de transmisión y de barrido.

En esta Tesis Doctoral se empleó la microscopía electrónica de transmisión para examinar los cambios morfológicos asociados a autofagia en las células sometidas a diversos tratamientos. Gracias a su alto poder de resolución, se detectaron diferencias en el número y tamaño de distintos componentes celulares (vacuolas, lisosomas, etc.).

Microscopía electrónica de transmisión

El microscopio electrónico de transmisión es capaz de observar la muestra mediante transiluminación (**Figura 4.12**). Para ello, se procesa y se corta la muestra en láminas ultrafinas de unos pocos nanómetros de grosor, las cuales se colocan en una rejilla de cobre. A continuación, se enfoca un haz de electrones sobre la muestra, donde parte de ellos son desviados, parte la atraviesan directamente y parte la atraviesan con diferentes grados de dispersión según el grosor y composición de la muestra. Estos electrones son modulados y dirigidos mediante un conjunto de lentes electromagnéticas para generar una imagen en diferentes intensidades de gris, que corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes.



Figura 4.12. Microscopio electrónico de transmisión *JEOL 1011*. Tiene acoplado una cámara digital de alto contraste *GATAN ORIUS SC200*. Imagen tomada en el Servicio de Microscopía de la UM.

4.2.4. INMUNOFLUORESCENCIA

La técnica de inmunofluorescencia es utilizada para la identificación y visualización de diversos componentes, especialmente proteínas, en células o tejidos. Se basa en la detección de antígenos mediante el uso de anticuerpos que se han conjugado con fluoróforos. En muchas técnicas, se utiliza un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) que se une al primario. En este último caso, conocido como inmunofluorescencia indirecta, es el anticuerpo secundario el que está conjugado con un fluoróforo. A pesar de que añadir un segundo anticuerpo requiere de más pasos para procesar las muestras, en esta Tesis Doctoral se llevó a cabo la inmunofluorescencia indirecta, ya que nos permitió visualizar diferentes proteínas utilizando, en muchas ocasiones, los mismos anticuerpos primarios empleados en otras técnicas, como el Western blot, con el mismo anticuerpo secundario. Es decir, nos permitió estudiar ciertas proteínas con una mayor sensibilidad y un menor costo.

Durante los ensayos de inmunofluorescencia, las células se cultivaron en cubreobjetos de cristal en una placa de 12 pocillos y se sometieron a los tratamientos elegidos. En el procesamiento primero se quitó el medio de cultivo y se realizaron dos lavados con PBS. Luego, las células se fijaron durante 10-15 minutos con paraformaldehído 4% a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados con PBS para eliminar cualquier resto de fijador. Para el estudio de proteínas intracelulares, se llevó a cabo un proceso de permeabilización con el reactivo Triton-X100 al 0.2% en PBS durante 7 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se bloquearon las uniones inespecíficas con BSA al 5% en PBS durante 1-2 horas. Después de la incubación, se hicieron dos lavados con PBS y las células se incubaron en una cámara húmeda con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C y en oscuridad. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas tres veces con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario durante 2 horas en la cámara húmeda a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se realizaron tres lavados con PBS y se procedió al montaje de las muestras. Las diluciones de los anticuerpos primario y secundario se prepararon en una solución de BSA al 5% en PBS. Los anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo que se utilizaron fueron los *Alexa Fluor Dyes* (Life Technologies), 488 y 633, que emiten respectivamente en la zona verde y roja del espectro electromagnético. En cuanto al montaje, cada cubreobjetos se puso en un portaobjetos con 14 µl de *Prolong Gold Antifade* (Invitrogen), un medio de montaje que incluye DAPI en su composición. El DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) es un colorante fluorescente que se adhiere fuertemente a las áreas ricas en pares de bases AT del ADN, lo que permite la visualización de los núcleos. Cuando se une al ADN de doble cadena, su máxima

excitación ocurre a una longitud de onda de 358 nm y su máxima emisión a 461 nm. Las preparaciones se dejaron secar en oscuridad y se visualizaron en el microscopio confocal *Leica STELLARIS 8* de la Sección de Microscopía de la UM.

4.2.5. INMUNOHISTOQUÍMICA

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que detecta antígenos en secciones de tejido utilizando anticuerpos específicos conjugados con marcadores para su detección. Al igual que en la inmunofluorescencia, se puede realizar una detección directa si el anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés está marcado o una detección indirecta si el anticuerpo secundario que reconoce al primero está marcado. En la IHQ, los anticuerpos utilizados se conjugan con la enzima peroxidasa, de forma que el revelado de las uniones antígeno-anticuerpo se lleva a cabo mediante la adición de un sustrato de peroxidasa que produce un producto coloreado que se puede cuantificar. En esta Tesis Doctoral, se empleó la IHQ para analizar muestras de pulmones y tumores de melanoma en ratón. Los pasos a seguir en esta técnica fueron:

Fijación, inclusión en parafina y corte de las muestras de tejido

Tras realizar los diferentes tratamientos en los ratones y su posterior biopsia, las muestras de tejido se fijaron con formaldehído al 10% durante 12 horas. El uso de líquidos fijadores asegura que las muestras mantengan su morfología y composición lo más parecido posible a su estado *in vivo*. El formaldehído produce enlaces cruzados entre proteínas, manteniendo así la estructura del tejido y evitando la degradación enzimática. Después de la fijación, las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en soluciones de alcohol con concentraciones crecientes: 1 hora en etanol al 50%, 1 hora en etanol al 70%, dos etapas sucesivas de 1 hora en etanol al 96%, y otras dos de 1 hora en etanol al 100%. Una vez deshidratadas, se llevó a cabo el proceso conocido como aclarado, donde las muestras se embebieron en una sustancia miscible con la parafina, xilol. Las muestras se sumergieron en dos fases sucesivas de xilol durante 1 hora cada vez y, después, en otra de 1 hora en una mezcla de xilol y parafina líquida. Luego, las muestras se sumergieron en dos baños sucesivos de parafina líquida durante 4 y 6 horas respectivamente, dentro de una estufa a 57-60°C para garantizar que la parafina penetrara adecuadamente en todos los espacios intra e intercelulares. Finalmente, las muestras se introdujeron en moldes rectangulares con parafina fundida y se dejaron enfriar. Se obtuvieron cortes histológicos de 5 µm de grosor de cada molde utilizando un micrótopo. Los cortes se colocaron en portaobjetos con recubrimiento de polilisina y se dejaron adherir durante 2 horas en una estufa a 37°C. En este paso, las muestras podían ser conservadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz.

Desparafinado e hidratación

Para ello, primero se delimitó el área de la muestra con un lápiz de punta de diamante para facilitar su correcta manipulación en etapas posteriores. El proceso de desparafinado se llevó a cabo sumergiendo los portaobjetos en tres baños de xilol sucesivamente, con una duración de 5 minutos cada uno. Posteriormente, las muestras fueron rehidratadas mediante la inmersión en soluciones de alcohol de concentración decreciente: 3 minutos en etanol al 100%, 3 minutos en etanol al 96%, 3 minutos en etanol al 70% y 3 minutos en agua.

Desenmascaramiento antigénico

La fijación de líquidos puede causar la formación de enlaces intracatenarios y/o entre distintas proteínas, lo que puede alterar la estructura tridimensional de los antígenos y dificultar su reconocimiento por los anticuerpos. Por lo tanto, es necesario un tratamiento que restaure la estructura original de los antígenos. El desenmascaramiento antigénico es el proceso por el cual se recupera la inmunoreactividad de los antígenos que han perdido esta propiedad debido al tratamiento de fijación. Se utilizan diferentes métodos de desenmascaramiento, como la aplicación de calor, el cambio de pH y el tratamiento con proteasas (por ejemplo, proteinasa K, tripsina, pepsina, etc.). Para desenmascarar nuestras muestras, se sumergieron en una solución de citrato sódico 10 mM a pH 6 y 0.05% Tween-20 y se incubaron en un baño termostático a 100°C durante 20 minutos. A continuación, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente dentro del tampón citrato y se lavaron una vez con PBS en agitación durante 3 minutos.

Inhibición de la actividad peroxidasa endógena

Debido a que el proceso de revelado de las muestras depende de la actividad catalítica de la enzima peroxidasa sobre un sustrato cromogénico, es necesario inhibir cualquier actividad peroxidasa intrínseca que pueda estar presente en el tejido, para evitar una tinción no específica. Para lograr esto, se incubaron las muestras en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol a temperatura ambiente y protegidas de la luz durante 20 minutos. El uso de una alta concentración de peróxido de hidrógeno puede provocar una inhibición por exceso de sustrato de la peroxidasa. Después, las muestras se lavaron primero una vez con PBS y luego una vez con PBS-T, ambos lavados en agitación y durante 5 minutos. PBS-T es una solución de PBS que contiene un 0.05% de Tween-20 (v/v).

Bloqueo de uniones inespecíficas

Al igual que en muchas técnicas de detección inmunológica, en la IHQ se lleva a cabo un proceso de bloqueo para evitar uniones inespecíficas antes de la incubación con los anticuerpos. Para esto, las muestras se incubaron en una solución de BSA al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. A continuación, las muestras fueron lavadas dos veces con PBS-T en agitación y a temperatura ambiente.

Incubación con el anticuerpo primario

Después del bloqueo, las muestras se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a una temperatura de 4°C en una cámara húmeda. Para ello, se preparó una solución del anticuerpo, a una concentración específica para esta técnica, utilizando BSA al 1% en PBS. Los controles negativos fueron incubados en una solución de PBS al 1% de BSA sin la presencia del anticuerpo.

Incubación con el anticuerpo secundario

Al día siguiente, tras la incubación del anticuerpo primario, las muestras fueron lavadas dos veces en agitación con PBS-T durante 5 minutos en cada lavado. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario durante 2 horas a temperatura ambiente en una cámara húmeda, seguido de dos lavados de 5 minutos cada uno con PBS-T. En este caso, se preparó una solución de dilución de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa utilizando BSA al 1% en PBS.

Revelado

Para realizar el revelado de las muestras se preparó una solución formada por PBS, 3,3'-diaminobencidina (DAB) y H₂O₂. Por ejemplo, para preparar 45 ml de esta mezcla se utilizaron 30 mg de DAB, 36 µl de H₂O₂ y se completó hasta 45 ml con PBS. La oxidación del DAB produce un color pardo-anaranjado. Las muestras fueron incubadas en esta solución durante 1-10 minutos, hasta que se observó la aparición de color en las muestras. Posteriormente, con el fin de evaluar la intensidad del marcaje, las muestras fueron lavadas con PBS y se observaron al microscopio óptico.

Tinción con hematoxilina y eosina

Para llevar a cabo el estudio por la técnica de IHQ, las muestras fueron procesadas por duplicado, lo que significa que se obtuvieron dos secciones consecutivas de la misma muestra, cada una con un grosor de 5 µm. Por un lado, en una de las secciones se realizó el montaje directamente después del revelado, con el fin de cuantificar la señal

de DAB sin interferencia de otros colorantes. La otra sección, tras el revelado, se sometió a tinción con hematoxilina-eosina para aumentar el contraste y facilitar la visualización de la estructura del tejido al microscopio. Para ello, las muestras se sumergieron en hematoxilina de Mayer durante 10 minutos y luego se lavaron con agua para quitar el exceso de colorante. A continuación, se introdujeron en eosina durante 30 segundos y se lavaron con etanol al 70% para eliminar el exceso de colorante. La hematoxilina es un colorante catiónico o básico que tiñe de azul violáceo las estructuras ácidas (basófilas), como los núcleos celulares. La eosina es un colorante aniónico o ácido que tiñe de color rosado las estructuras básicas (acidófilas), como los citoplasmas.

Deshidratación y montaje

Los duplicados de las muestras fueron sometidos a un proceso de deshidratación y posterior aclaramiento mediante la incubación sucesiva en etanol 70%, etanol 96%, etanol 100% y xilol, durante 3 minutos en cada etapa. Se dejaron secar las muestras, se añadieron 3 gotas de medio de montaje DPX a cada portaobjetos con su muestra y se colocaron los respectivos cubreobjetos. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente para su posterior análisis al microscopio óptico.

Cuantificación de la señal

Para llevar a cabo la cuantificación de las señales se tomaron imágenes electrónicas de cada portaobjetos utilizando el escáner de portas microscópicos *SCN400F* (Leica Microsystems). La cuantificación adecuada y precisa de la tinción generada por la oxidación del DAB necesita de un protocolo diferente al utilizado en la densitometría tradicional. El producto de reacción del DAB no muestra una absorbancia de luz verdadera y no cumple la ley de Lambert-Beer. En cambio, este cromógeno presenta diferentes espectros de "absorción" a diferentes intensidades de tinción. Esto supone un desafío al evaluar cuantitativamente las tinciones inmunohistoquímicas, por lo que se han desarrollado métodos como el "factor de intensidad recíproca" para abordar esta cuantificación, el cual fue utilizado para el estudio de nuestras muestras.

Para ello, las imágenes se analizaron con el programa *ImageJ*. Se definieron varias regiones de interés (ROI, *region of interest*) con el mismo tamaño en la zona de estudio de las muestras tratadas y no tratadas con el fin de obtener la intensidad integrada de la señal de tinción. Esta señal se normalizó considerando la intensidad promedio de la señal de fondo (BMI, *background mean intensity*). Así, el factor de intensidad recíproca del cromógeno (CRIF, *chromogen reciprocal intensity factor*) se calculó con la fórmula:

$$CRIF = \text{Intensidad integrada de la señal} - (\text{Área de la ROI} \times BMI)$$

4.2.6. CITOMETRÍA DE FUJO

La citometría de flujo es una técnica biofísica que posibilita el análisis de diversas características y procesos de células individuales o partículas en suspensión. La citometría de flujo se fundamenta en el uso de un dispositivo compuesto por un sistema de fluidos, un sistema láser, detectores electrónicos, convertidores de señal analógico-digitaes y un ordenador. El citómetro de flujo se caracteriza por la capacidad de alinear las células o partículas de forma secuencial, una a una, a medida que atraviesan un fino hilo de líquido, así como por la posibilidad de hacer incidir uno o varios láseres de manera individual sobre estas células o partículas.

La citometría de flujo permite analizar cada partícula según la dispersión de luz visible o la presencia de sondas fluorescentes. En la caracterización de las partículas, se utilizan varios detectores como el detector FSC (*forward scatter*) que mide la dispersión frontal de la luz y determina el tamaño, así como el detector SSC (*side scatter*) que mide la dispersión lateral de la luz y da información sobre la complejidad. Además, hay uno o más detectores de fluorescencia (también llamados fotomultiplicadores) que permiten una cuantificación y análisis más detallados gracias al marcaje de las muestras de interés para que emitan fluorescencia en diferentes longitudes de onda y puedan ser clasificadas de forma individual. Hay varias formas de lograr esto, siendo las más comunes la transfección de las células con proteínas fluorescentes, como la proteína verde fluorescente o GFP (*green fluorescent protein*), así como el uso de sondas fluorescentes o el marcado con anticuerpos conjugados a estas sondas.

Una vez que la señal de fluorescencia y dispersión de luz ha sido capturada por los detectores, se integra mediante convertidores analógico-digitaes y se transmite al ordenador. De esta manera, el usuario puede analizar y representar los resultados utilizando un programa de análisis de datos. Las dos opciones principales de representar los datos obtenidos por citometría de flujo son mediante un diagrama de puntos o "dot plot" y/o mediante un histograma (**Figura 4.13**). En la primera, una variable (como el tamaño, la granularidad o la fluorescencia) se representa en el eje de abscisas y otra en el eje de ordenadas. Cada punto en el gráfico corresponde a los valores x e y de cada partícula. En la segunda forma, se representa una variable en el eje de abscisas y el número de partículas en el eje de ordenadas. Es importante destacar la flexibilidad de análisis que ofrece la citometría de flujo, ya que posibilita la selección de poblaciones celulares específicas (conocido como "gating" en inglés) y su análisis por separado.

En esta Tesis Doctoral se empleó la citometría de flujo para analizar el ciclo celular, la expresión de marcadores intracelulares y la expresión de marcadores de membrana tanto en células de melanoma como en células del sistema inmunitario.

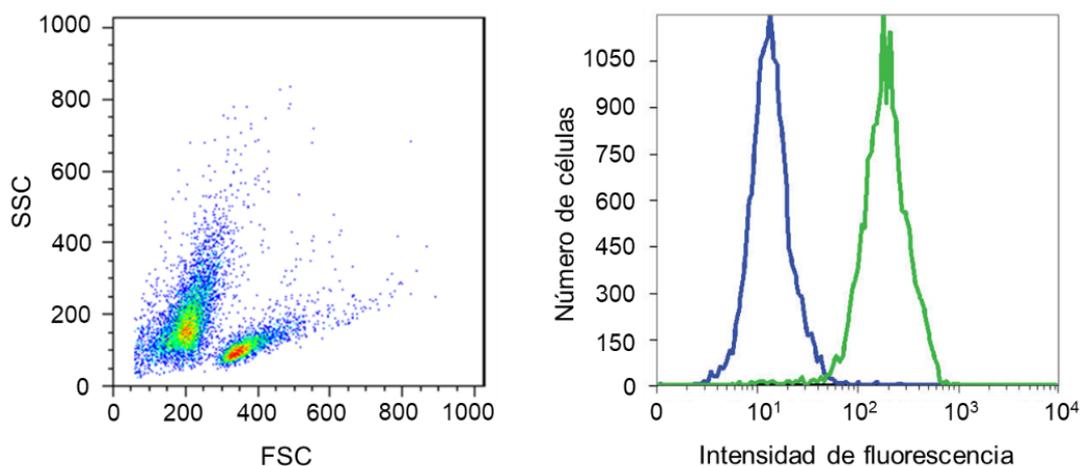


Figura 4.13. Diagrama de puntos o “dot plot” con un doble marcaje (izquierda) e histograma que representa la intensidad de fluorescencia de un determinado marcador (derecha). FSC: dispersión frontal de la luz, SSC: dispersión lateral de la luz. Imágenes adaptadas de Cell Signalling Technology.

4.2.6.1. Análisis de marcadores mediante citometría de flujo

En el análisis de marcadores, las células fueron tratadas con tripsina y posteriormente lavadas con PBS. En función del objeto de estudio, proteínas de membrana o proteína intracelulares, se llevará a cabo un procesamiento distinto de las muestras. Además, también pueden producirse pequeñas variaciones en los protocolos debido al tipo de muestra y de marcador que se quiere estudiar. En general, los pasos que se siguieron fueron: procesamiento y tinción de proteínas, adquisición de células y análisis de datos.

1a. Procesamiento y tinción de proteínas intracelulares (con permeabilización)

Este protocolo fue utilizado para procesar aquellas muestras en las que nos interesaba analizar y cuantificar proteínas intracelulares, así como la fracción total de aquellas proteínas que se expresaban tanto dentro de la célula como a nivel de membrana. Para ello, se llevó a cabo un protocolo que permitió la permeabilización de las células. Primero se realizó la tripsinización de las muestras celulares, se lavaron una vez con PBS, mediante centrifugación a 1400 rpm durante 4 minutos, y se cogieron 1×10^6 células. A continuación, se llevó a cabo la fijación y permeabilización de las células con metanol 100% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un bloqueo de posibles uniones inespecíficas durante 5 minutos con el tampón de incubación (IB, *incubation buffer*), formada por BSA al 0,5% en PBS.

Transcurrido este tiempo, se lavaron las células con el mismo IB durante 4 minutos a 2000 rpm y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración indicada en cada caso. Luego, se lavaron las muestras con el IB durante 2 minutos a 4000 rpm para quitar el exceso de anticuerpo que no quedó unido y se incubaron con el adecuado anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Finalmente, las células se lavaron con el IB durante 4 minutos a 2000 rpm y se resuspendieron en PBS para su posterior adquisición. Los anticuerpos utilizados en este trabajo fueron disueltos en el IB a la concentración indicada en cada caso.

1b. Procesamiento y tinción de proteínas de membrana (sin permeabilización)

En este protocolo se llevaron a cabo algunas variaciones en función de las muestras de estudio. Para evaluar y cuantificar ciertas proteínas de membrana en las células de melanoma se utilizó un procesamiento diferente al empleado para identificar y cuantificar las células del sistema inmune.

Por un lado, para el estudio de proteínas de membrana, las células fueron tripsinizadas y lavadas con PBS frío durante 5 minutos a una velocidad de centrifugación de 1400 rpm y una temperatura de 4°C. Se cogieron 1×10^6 células para cada condición experimental y se fijaron con paraformaldehído a 4°C durante 10 minutos. A continuación, se lavaron las células con PBS durante 5 minutos a 1400 rpm y se incubaron durante 10-15 minutos con el IB a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario correspondiente durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo un lavado con el IB y la incubación con el pertinente anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, las células fueron lavadas con el IB durante 4 minutos a 2000 rpm y resuspendidas en PBS para su posterior adquisición. Los anticuerpos empleados fueron disueltos en el IB a la concentración indicada en cada caso.

Por otro lado, en el estudio de las células del sistema inmune obtenidas a partir de los bazos y/o sangre de los experimentos con ratones, el procesamiento fue diferente. Una vez extraídos los leucocitos del bazo y lavados con SBF al 4% en PBS, o bien directamente de las muestras de sangre, se tomaron alícuotas para añadir la solución *Türk* y conocer el número de leucocitos totales. El reactivo *Türk* (de Kanalvet) contiene ácido acético para hemolizar los eritrocitos y a la vez permite teñir los leucocitos. A continuación, cogemos 500000 células y las llevamos a un volumen de 100 μ l de SBF al 4% en PBS para añadir la cantidad de anticuerpo correspondiente e incubar durante

15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. En este caso, los anticuerpos que se utilizaron ya estaban conjugados con fluorocromos, por lo que no se necesitaba de un segundo anticuerpo. Transcurrido ese tiempo, se realizó una incubación con *BD-FACS lysis solution* (Becton Dickinson) a una concentración de 1X, temperatura ambiente, protegida de la luz y por un tiempo de 5 minutos. Esta solución de lisis ha sido desarrollada específicamente para lisar los glóbulos rojos y fijar los leucocitos tras la tinción directa de inmunofluorescencia en células sanguíneas periféricas humanas utilizando anticuerpos monoclonales, como paso previo al análisis mediante citometría de flujo. Con respecto al volumen de esta solución de lisis, se añadieron unos 3 ml para las muestras procedentes de 1 ml de sangre (mayor contenido de eritrocitos), mientras que para las células obtenidas de dos bazos fue suficiente con 700 μ l. Luego, se realizaron dos lavados de las células con SBF al 4% en PBS para eliminar tanto el exceso de anticuerpo como la solución de lisis mediante centrifugación a 1500 rpm de 5 minutos cada lavado. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS y se guardaron a 4°C para su posterior evaluación en el citómetro.

Adquisición de células en el citómetro de flujo

Para evaluar y analizar el marcaje de las muestras utilizadas en esta Tesis Doctoral, se utilizaron los citómetros de flujo *FACSCalibur Cell-Quest* (Becton Dickinson) y *LSRFortessa X-20* (Becton Dickinson), situados en la SCT de los edificios del ACTI y del LAIB, respectivamente (**Figura 4.14**). El primer citómetro permite analizar hasta 6 parámetros diferentes, ya que está equipado con un láser de argón que emite luz a una longitud de onda de 488 nm, y cuenta con cuatro detectores de fluorescencia, etiquetados como FL1, FL2, FL3 y FL4. En cambio, el citómetro *LSRFortessa X-20* cuenta con una configuración óptica de alta calidad que incluye hasta cinco láseres diferentes, lo que permite el estudio de un mayor número de parámetros, pudiendo llegar hasta 20. Debido a su capacidad de detección multiparamétrica y, sobre todo, a su configuración óptica flexible el citómetro *LSRFortessa X-20* se utilizó principalmente para la evaluación de las células del sistema inmune, ya que permitió analizar varios marcadores en cada célula de forma simultánea y sin interferencias.



Figura 4.14. Citómetros de flujo *FACSCalibur Cell-Quest* (izquierda) y *BD LSRFortessa X-20* (derecha). Imágenes tomadas en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

Análisis de los datos obtenidos en el citómetro de flujo

Los datos fueron analizados utilizando los programas informáticos *Cell-Quest Pro* (BD Biosciences) y *FACSDiva* (BD Biosciences). Estos programas proporcionan herramientas para realizar análisis de datos avanzados, como la generación de histogramas, la determinación de subpoblaciones celulares y la representación gráfica de los resultados.

4.2.6.2. Análisis del ciclo celular mediante citometría de flujo

La técnica de citometría de flujo también se utiliza para determinar la cantidad de ADN presente en una célula, lo que a su vez proporciona información sobre la fase del ciclo celular en la que se encuentra. Para ello, se utiliza el yoduro de propidio (PI, *propidium iodide*), un colorante fluorescente que se une de manera proporcional al ADN. La cantidad de colorante unido refleja la cantidad de ADN en las células analizadas. En este sentido, las células en fase G2 o M presentan una fluorescencia duplicada en comparación con las células en fase G0 o G1. Por otro lado, las células en fase S muestran una fluorescencia intermedia entre las células en fase G0/G1 y G2/M. Además, la fase subG0/G1 indica que las células tienen una cantidad de ADN inferior a las células en fase G0/G1, y se asocia comúnmente con células muertas o apoptóticas (**Figura 4.15**).

Así pues, para los estudios realizados sobre el ciclo celular, primero se tripsinizaron las células y se resuspendieron 1×10^6 células en un volumen de 200 μl de PBS a 4°C. A continuación, se añadieron 750 μl de etanol 100% a las muestras y se incubaron durante 1 hora en hielo. Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron centrifugadas a una velocidad de 2000 rpm durante 4 minutos y se resuspendieron en 250 μl de una

mezcla formada por varios reactivos. Esta mezcla contenía yoduro de propidio a una concentración final de 50 $\mu\text{g/ml}$, ARNasa A a 0.1 mg/ml y Triton-X100 al 0.05%, disueltos en PBS. La ARNasa A se utiliza para digerir el ARN presente en las muestras y evitar su unión al PI, lo que podría generar una señal falsa durante el análisis. El Triton-X100 es un detergente no iónico empleado para desnaturalizar membranas celulares, lo que facilitaría la entrada del PI a la célula. Las muestras se incubaron durante 40 minutos a 37°C protegidas de la luz. Después, se añadieron 750 μl de PBS a las muestras, se centrifugaron a 2000 rpm 2 minutos y se resuspendieron en 250 μl de SBF 5% en PBS. Por último, se llevó a cabo el análisis de las muestras tras su adquisición en el citómetro de flujo.

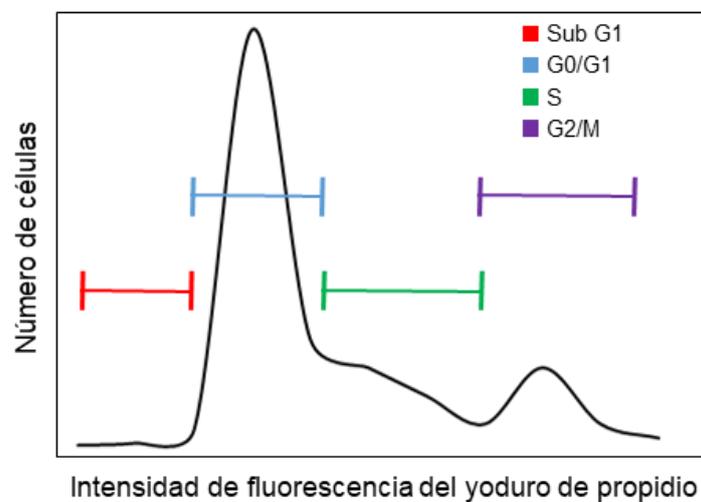


Figura 4.15. Histograma representativo de las diferentes fases del ciclo celular después de la tinción con yoduro de propidio. Imagen adaptada de Nexcelom Bioscience.

4.2.7. ANÁLISIS DEL METABOLISMO CELULAR

El dispositivo *Seahorse XFe96 Analyzer* (**Figura 4.16**) es una potente herramienta que permite medir y registrar en tiempo real la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *oxygen consumption rate*), la tasa de salida de protones (PER, *proton efflux rate*) o la tasa de acidificación extracelular (ECAR, *extracellular acidification rate*), así como las tasas de producción de ATP de células vivas en placas de 96 pocillos. Las tasas de OCR, PER o ECAR y producción de ATP son indicadores importantes del metabolismo energético y proporcionan información vital sobre la salud mitocondrial, toxicidad, glucólisis y la función general de las células. En conjunto, estas mediciones proporcionan una visión a nivel de sistema de la función metabólica celular en células cultivadas y muestras *ex vivo*.



Figura 4.16. Dispositivo *Seahorse XFe96 Analyzer* (Agilent Technologies). Imagen tomada en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

En esta Tesis Doctoral se utilizó el kit *Glycolytic Rate Assay* de Agilent Technologies para determinar la medida de glucólisis de las células bajo diferentes condiciones experimentales. Este kit está basado en la conversión de glucosa en lactato, lo que origina una producción neta y salida de protones al medio extracelular (**Figura 4.17**).

El ensayo comienza incubando las células en el *Seahorse XF Glycolytic Rate Assay Medium*, el cual contiene sustratos como glucosa, glutamina y piruvato, además de un tampón HEPES. Durante esta etapa, se registran las tasas basales de consumo de oxígeno durante tres períodos de medición para establecer una referencia. Luego, se realiza la primera inyección de Rotenona y Antimicina A (Rot/AA), que son inhibidores de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (**Figura 4.17**). Estos inhibidores reducen el consumo de oxígeno mitocondrial y, por consiguiente, la producción de protones derivados del CO₂. Esto permite evaluar el impacto de la función mitocondrial en el metabolismo celular. La segunda inyección consiste en 2-deoxi-D-glucosa (2-DG), un análogo de la glucosa que actúa como un inhibidor de la glucólisis. El 2-DG se une de manera competitiva a la enzima glucosa hexoquinasa, que es la primera enzima de la vía glucolítica. Al inhibir la glucólisis, se observa una disminución en PER. Esto confirma de manera cualitativa que la PER producida antes de la inyección se debe principalmente a la actividad de la glucólisis (**Figura 4.17**). Así, este ensayo permite obtener información valiosa sobre la contribución de la función mitocondrial y la glucólisis en el metabolismo celular, permitiendo un análisis más completo de la vía metabólica y sus implicaciones en diferentes condiciones experimentales.

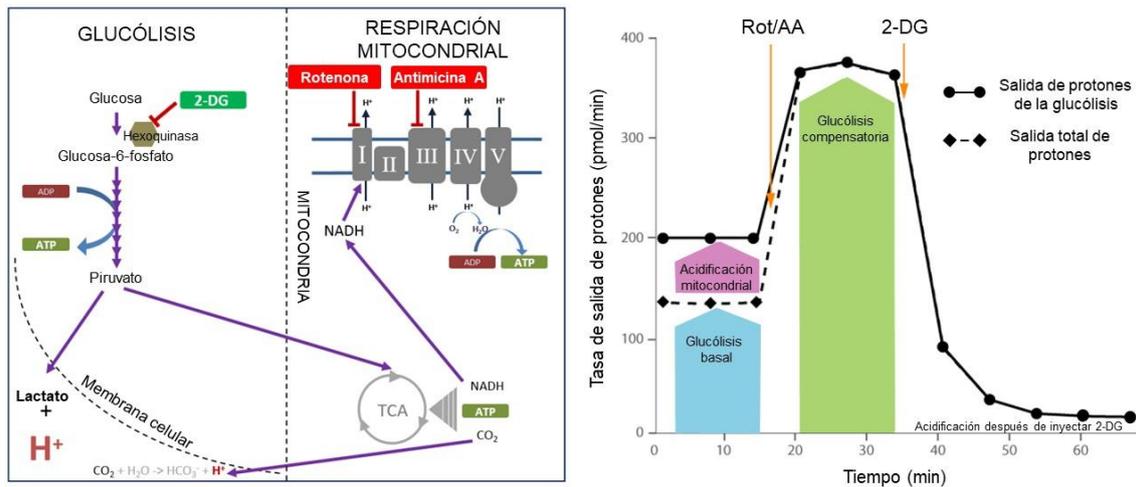


Figura 4.17. Fundamento del ensayo empleado para la medida de glucólisis celular. Se muestra un esquema que indica el lugar de acción de los diferentes inhibidores empleados (izquierda) y el perfil de la gráfica obtenida a partir de la medida de la producción de protones (derecha). 2-DG: 2-deoxi-D-glucosa. Imágenes traducidas del protocolo del kit *Glycolytic Rate Assay* (Agilent Technologies).

Para realizar este ensayo se necesitaron tres días. El primer día se sembraron las células en la microplaca de cultivo celular *Agilent Seahorse XF* a una densidad predeterminada, utilizando el medio de cultivo celular adecuado. Se recomienda una densidad celular de 70-90% de confluencia para el día del ensayo. En el siguiente día, las células fueron sometidas al tratamiento pertinente y se encendió el analizador *Seahorse XFe96* para permitir que alcanzara la temperatura de estabilización. Asimismo, se dejó hidratar con agua destilada un cartucho sensor suministrado por Agilent Technologies durante la noche en un incubador a 37°C sin CO_2 , siguiendo el procedimiento básico indicado. El día del ensayo, se eliminó el agua del cartucho sensor y se incubó con el reactivo calibrador de Agilent Technologies durante 1-2 horas en un incubador a 37°C sin CO_2 . Mientras tanto, se preparó el medio de ensayo *Agilent Seahorse Glycolytic rate*. Para ello, se utilizó el medio DMEM o RPMI suministrado por Agilent Technologies con pH 7.4, suplementados con 1 mM de piruvato, 2 mM de glutamina y 10 mM de glucosa. Además, el medio de ensayo se puso a 37°C en un baño de agua. Una vez que el medio de ensayo estaba en las condiciones óptimas, se sustituyó el medio de cultivo de las células por el medio de ensayo y se incubó la microplaca 1 hora en un incubador a 37°C sin CO_2 . En este tiempo se procedió al cargado del cartucho sensor con los inhibidores correspondientes. En este sentido, se añadieron 20 μ l de Rot/AA en el puerto A y 22 μ l de 2-DG en el puerto B, cuyas concentraciones por pocillo fueron 0.5 μ M y 50 mM respectivamente. El uso de dos puertos diferentes permitió que se realizaran dos inyecciones de forma secuencial. Para la normalización de los resultados se utilizó una concentración de 2.5 μ M en cada pocillo

de reactivo de Hoechst. Para ello, se añadieron 3 µl de una solución madre de 25 mM a los 3 ml del reactivo 2-DG, ya que fue el inhibidor utilizado en el último puerto de inyección del ensayo. Transcurrido el tiempo de incubación de las células con el medio de ensayo, se sustituyó el medio por 180 µl de medio de ensayo fresco. A continuación, se colocó el cartucho sobre la microplaca con las células y se introdujo en el *Seahorse XFe96 Analyzer* para comenzar el análisis. Finalmente, después de 30 minutos de la última lectura del analizador, se realizó la lectura de la microplaca en el lector de placas *FLUOstar Omega* en las condiciones adecuadas para obtener la información correspondiente a la tinción de Hoechst necesaria para la normalización de los resultados. Los datos fueron evaluados mediante el programa informático específico conocido como *Agilent Seahorse Analytics* que incluye flujos de trabajo estandarizados y herramientas de análisis de datos avanzadas.

4.2.8. ENSAYOS DE LUCIFERASA

Los ensayos de luciferasa son ampliamente utilizados en investigaciones biológicas y bioquímicas para estudiar diversos procesos y fenómenos. Se emplean como una herramienta para cuantificar la actividad de promotores, elementos de respuesta, factores de transcripción y otras proteínas regulatorias en estudios de expresión y regulación génica. El principio fundamental de estos ensayos radica en la medida de bioluminiscencia como producto de una reacción química específica catalizada por una enzima luciferasa. Estas enzimas se fusionan con secuencias reguladoras de genes de interés, como promotores o elementos de respuesta, lo que permite cuantificar la actividad de estos elementos en células o sistemas biológicos.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos (10000 células por pocillo) y transfectadas utilizando *Fugene 6* (Promega) mediante una dilución 1:3 de ADN (µg) y *Fugene* (µl) respectivamente. Para la transfección se usó *Opti-MEM* como medio de transfección. Primero se mezcló la cantidad adecuada de *Fugene* y *Opti-MEM* y se incubó unos 5 minutos a temperatura ambiente. Después, se añadió la cantidad necesaria de esta mezcla a los plásmidos adecuados para cada condición experimental manteniendo la relación 1:3 de ADN y *Fugene* y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se agregaron 5 µl de la mezcla de transfección a cada pocillo. Transcurridas 48 horas desde la transfección se llevó a cabo la medida de expresión de luciferasa. Para ello, se usó el reactivo *LightSwitch Luciferase Assay Reagent LS010* de *SwitchGear Genomics*, siguiendo las instrucciones proporcionadas. En primer lugar, se preparó el medio de ensayo, el cual estaba formado por una mezcla de sustrato y tampón de lisis. Por cada 1 ml de tampón de lisis se

necesitaron 10 µl de sustrato. A continuación, se retiró el medio de cultivo de las células y se añadieron 100 µl de medio de ensayo a cada pocillo. Las células se lisaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación y en oscuridad. Luego, se transfirió todo el volumen del pocillo a una placa de 96 pocillos de fondo blanco adecuada para realizar la lectura la actividad de la luciferasa por triplicado mediante el lector de placas *FLUOstar Omega* (BMG Labtech).

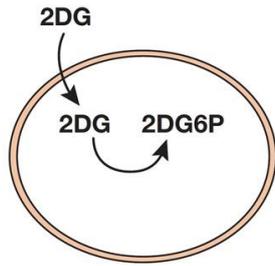
El plásmido del promotor de ADAM10 (RenSP, #S722690), así como el promotor vacío (#S790005) utilizado como control, ambos combinados con el gen de expresión para luciferasa, fueron obtenidos de la colección *The LightSwitch Promoter Reporter GoClone* de SwitchGear Genomics. Para la expresión de MITF, se utilizaron diferentes cantidades del plásmido pCMV14-3xFLAG-MITF, el cual fue generado clonando el ADNc de MITF-M en el vector p3xFLAG-CMV-14 de Merck Millipore.

Para generar el mutante del plásmido promotor de ADAM10 junto con el gen de expresión de luciferasa, se utilizó el plásmido anterior (RenSP, #S722690) como molde, realizando una mutación específica en la secuencia de unión de MITF (E-Box), cambiando CACGTG por CTGGTG. Estas mutaciones puntuales fueron introducidas utilizando el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies), siguiendo el protocolo descrito en el apartado 4.4.11. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS MUTANTES.

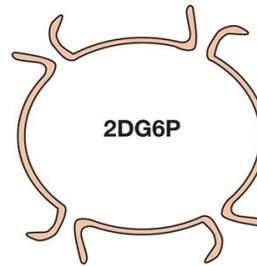
4.2.9. MEDIDA DE LA GLUCOSA INTRACELULAR

El ensayo *Glucose Uptake-Glo* (Promega) es una técnica no radiactiva que utiliza la detección de 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato (2DG6P) para medir la captación de glucosa por parte de las células. Al añadir 2-deoxi-D-glucosa (2DG) a las células, esta se transporta a través de la membrana y se fosforila de manera similar a la glucosa. Sin embargo, el 2DG6P, a diferencia de la glucosa-6-fosfato (G6P), no puede ser modificado por las enzimas que trabajan con el G6P. Como resultado, el 2DG6P, que no puede atravesar la membrana, se acumula dentro de la célula. Después se elimina cualquier NADPH presente en las células y se añade la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) para que oxide el 2DG6P, reduciendo simultáneamente el NADP⁺ a NADPH. Este NADPH es utilizado por la reductasa suministrada para convertir el sustrato de proluciferina en luciferina, que a su vez será empleado como sustrato por la enzima luciferasa para generar una señal luminiscente proporcional a la concentración de 2DG6P. De esta manera, se puede determinar la cantidad de glucosa que ha sido captada por las células en estudio (**Figura 4.18**).

Paso 1. Añadir 2DG a las células.



Paso 2. Lisar las células y eliminar NADPH.



Paso 3. Añadir la mezcla de detección.

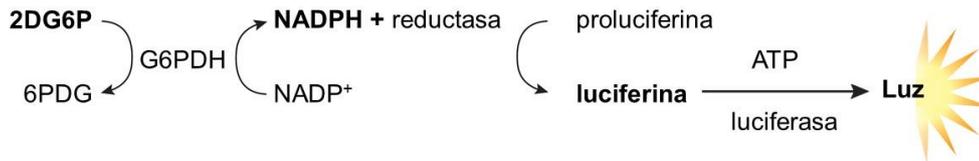


Figura 4.18. Esquema del ensayo empleado para medir la captación de glucosa por parte de las células. 2DG: 2-deoxi-D-glucosa, 2DG6P: 2-deoxi-D-glucosa-6-fosfato, G6PDH: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. Imagen adaptada del protocolo del kit *Glucose Uptake-Glo* (Promega).

Para llevar a cabo el ensayo, las células fueron cultivadas y tratadas en placas de 96 pocillos. Primero, se lavaron con 100 μ l PBS para eliminar cualquier resto de glucosa presente en el medio de cultivo. A continuación, se añadieron 50 μ l de una solución de 2DG preparada a una concentración de 1 mM por pocillo. Se agitó brevemente e incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de esta incubación, se añadieron 25 μ l de un tampón de parada para lisar el NADPH de la célula y se agitó brevemente. Luego, se añadieron 25 μ l de un tampón de neutralización y se agitó de nuevo. Seguidamente, se añadieron 100 μ l de la mezcla de detección, la cual fue preparada justo antes de realizar el ensayo y contenía las enzimas G6PDH, reductasa y luciferasa, el cofactor NADP⁺ y el sustrato de proluciferina. Las células fueron incubadas con este reactivo de detección durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalmente, se utilizó el lector de placas *FLUOstar Omega* (BMG Labtech), configurando una integración de 0.3 a 1 segundo, para registrar la señal de luminiscencia.

4.2.10. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

Los ensayos de citotoxicidad desempeñan un papel clave en el estudio de la función de las células efectoras del sistema inmune, como los linfocitos T citotóxicos y las células NK. Entre ellos, destaca el ensayo de liberación de cromo 51 (⁵¹Cr), que permite identificar las células tumorales diana con este radioisótopo. Así, cuando las células diana son eliminadas por los linfocitos T citotóxicos o las células NK, el ⁵¹Cr se libera al medio, lo que permite evaluar el nivel de citotoxicidad inducido por las células efectoras.

En esta Tesis Doctoral se utilizó el ensayo de liberación de ^{51}Cr con el fin de evaluar la capacidad de las células NK, obtenidas a partir de los bazos de ratones tanto atómicos como C57BL/6, para eliminar células tumorales. Además, como control positivo de la actividad citotóxica, se utilizaron las células de linfoma de ratón YAC-1.

El día anterior al ensayo, se procedió al marcaje de las células tumorales diana en placas de 96 pocillos, así como al aislamiento de las células NK a partir de bazos de ratones tratados con diferentes condiciones. Por un lado, se contaron las células diana y se calculó el número de células necesario para sembrar una concentración de 5000-7000 células por cada 100 μl de medio de cultivo por pocillo. A continuación, se añadieron 100 μCi de ^{51}Cr por cada 10^6 células. Después, se distribuyeron 100 μl de la suspensión celular en cada pocillo y se incubó toda la noche a 37°C , 95% de humedad y 5% de CO_2 . Por otro lado, como se describe más adelante (apartados 4.3.6.1. Separación de células mononucleares por centrifugación isopícnic y 4.3.7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK), se llevó a cabo la separación de las células mononucleares mediante el uso del Histopaque-1077 por centrifugación isopícnic y el posterior aislamiento de las células NK utilizando el kit *Mouse NK Cell Isolation II* de Miltenyi Biotech. Estas células efectoras inmunitarias fueron activadas añadiendo 200 unidades/ml de IL-2 (Thermo-Fisher) durante 24 horas.

El día del ensayo, se lavaron las células tumorales diana dos veces con 200 μl de PBS y tras el último lavado, se dejaron en 100 μl de medio de cultivo completo. Sobre estas células diana marcadas con ^{51}Cr , se añadieron las células efectoras utilizando proporciones variables efector/diana manteniendo el volumen constante. A continuación, se realizó una centrifugación de 1 minuto a $100 \times g$ para que las células efectoras se desplazaran al fondo del pocillo y se pusieran en contacto con las células diana. Se dejaron incubar durante 4 horas a 37°C con 95% de humedad y 5% de CO_2 . Para calcular la liberación máxima y espontánea de ^{51}Cr , las células diana se mezclaron con Triton-X100 al 2% en PBS o con medio, respectivamente. Transcurrido el tiempo de co-cultivo, se centrifugó la placa a $200 \times g$ durante 2 minutos y se transfirieron 100 μl de sobrenadante a una placa nueva de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 100 μl del cóctel de centelleo a cada pocillo y se cuantificó la radiactividad utilizando el contador de centelleo gamma *Wizard2 2480* de Perkin Elmer (**Figura 4.19**). La actividad citotóxica específica (%) de las células efectoras (liberación de ^{51}Cr) se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Liberación experimental} - \text{Liberación espontánea}}{\text{Liberación máxima} - \text{Liberación espontánea}} \times 100$$



Figura 4.19. Contador de centelleo gamma *Wizard2 2480* de Perkin Elmer. Imagen tomada en la Sección de Radioprotección y Residuos de la UM.

4.3. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

4.3.1. DETECCIÓN DE CONTAMINACIONES POR MICOPLASMA

La detección rápida y sencilla de la contaminación por micoplasma en cultivos celulares se llevó a cabo mediante el uso del kit *MycoAlert Mycoplasma Detection*. Estos ensayos bioquímicos selectivos, desarrollados por Lonza, permiten identificar la presencia de micoplasmas en los cultivos celulares. Estas pruebas se basan en la actividad enzimática propia de los micoplasmas. Los micoplasmas viables presentes en el sobrenadante del cultivo celular, se lisarán y las enzimas micoplasmáticas liberadas reaccionarán con el sustrato del kit. Esta reacción catalizará la conversión de ADP en ATP. A continuación, el ATP generado se transformará en una señal luminosa mediante la acción de la enzima luciferasa presente en el reactivo del kit. Al medir el nivel de ATP en la muestra antes de la adición del sustrato (lectura A) y después de su adición (lectura B), se podrá determinar una proporción que indicará la presencia o ausencia de micoplasma en la muestra.

De forma periódica se utilizó el kit *MycoAlert Mycoplasma Detection* con el fin de detectar lo antes posible cualquier contaminación por micoplasmas en los cultivos celulares. Para ello, antes de realizar el subcultivo de las células, se cogieron unos 2 ml de medio y se centrifugó a $200 \times g$ durante 5 minutos. A continuación, se transfirieron 50 μ l del sobrenadante a una placa de 96 pocillos de fondo blanco. Se cogieron varias alícuotas para tener triplicados de la medida. Además, se utilizaron 50 μ l de los reactivos incorporados en el kit como controles negativos y positivos. Luego, se añadieron 50 μ l del reactivo del kit a cada pocillo y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido ese tiempo, se tomó la primera lectura de luminiscencia utilizando un lector de placas. Seguidamente, se agregaron 50 μ l del sustrato del kit y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, se tomó la segunda medida de luminiscencia y se calculó la relación obtenida entre la segunda medida y la primera. Si la relación es menor de 1, la prueba se considera negativa en contaminación por micoplasmas, mientras que si la relación es mayor de 1 se considera positiva.

4.3.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE BRADFORD

El método de Bradford es una técnica colorimétrica que se utiliza para cuantificar proteínas. El reactivo que se emplea para este proceso se conoce comúnmente como "Reactivo de Bradford", y se prepara utilizando como colorante el *Coomassie Brilliant Blue G-250*. Este colorante tiene un carácter hidrofóbico que le permite incorporarse al

interior de las proteínas y generar un intenso color azul que puede medirse mediante espectrofotometría. Por tanto, el método de Bradford se basa en la interacción entre el colorante hidrofóbico y las proteínas, lo que significa que la presencia de contaminantes en la muestra, como los detergentes, pueden influir en la sensibilidad de la medida al afectar la estructura de las proteínas.

Para cuantificar la cantidad de proteína en las muestras, se preparó el reactivo comercial de Bradford (BioRad) mediante su dilución en agua destilada en una proporción de 1:4 (v/v). Luego se diseñó una recta patrón con BSA para comparar las absorbancias obtenidas a partir de las muestras. Se utilizó la BSA como proteína de referencia y se preparó una solución madre de 0.5 mg/ml. A partir de esta solución madre se pipetearon varios volúmenes para generar una serie de diluciones (**Tabla 4.1**).

	Stock de BSA a 0.5 mg/ml	Agua destilada (µl)	µg de BSA en 50 µl
Blanco	0	200	0
1	5	195	0.625
2	10	190	1.25
3	15	185	1.875
4	20	180	2.5
5	25	175	3.125
6	30	170	3.75
7	35	165	4.375
8	40	160	5

Tabla 4.1. Cálculos para elaboración de la recta patrón de BSA.

Se utilizó una placa de 96 pocillos para realizar el ensayo. En cada pocillo se agregaron 50 µl de cada una de las diluciones de BSA y se añadieron 200 µl del reactivo de Bradford, resultando en un volumen final de 250 µl en cada pocillo. La placa se agitó y se midió la absorbancia a 595 nm. Se realizó un duplicado para cada dilución. Finalmente, se trazó una recta patrón con la absorbancia en el eje de ordenadas y la concentración de BSA en el eje de abscisas, y se calculó la ecuación de la recta.

La medida de las muestras se realizó de la misma forma que los patrones. Para cada 50 µl de muestra, se agregaron 200 µl del reactivo de Bradford. El valor de absorbancia obtenido se introdujo en la ecuación de la recta para determinar el valor de concentración de proteína.

4.3.3. ELECTROFORESIS

La electroforesis es un método de separación de moléculas que se fundamenta en el desplazamiento que experimenta cualquier molécula con carga cuando se expone a un campo eléctrico. Las técnicas de electroforesis se utilizan de manera extensa para purificar y caracterizar moléculas con carga, como ácidos nucleicos y proteínas. En general, los ácidos nucleicos se separan utilizando geles de agarosa y las proteínas mediante el uso de geles de poliacrilamida.

4.3.3.1. SDS-PAGE

La electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, *sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) es una de las técnicas más utilizadas para separar mezclas de proteínas, cuyo protocolo fue descrito por Laemmli en 1970. Se lleva a cabo en unas condiciones en las que las proteínas son desnaturalizadas antes de la migración, de manera que el desplazamiento sea proporcional a la carga y tamaño de la molécula, pero no a su forma. El β -mercaptoetanol es el agente desnaturalizante más utilizado, ya que destruye los puentes disulfuro en las proteínas. Además, en esta técnica se utiliza el detergente aniónico SDS, el cual confiere carga negativa a las proteínas y se une a ellas de manera proporcional a su tamaño. Esto significa que la relación carga/masa final es constante para todas las proteínas. Como resultado, las proteínas se separan en el gel únicamente en función de sus diferencias de peso molecular: a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Durante esta Tesis Doctoral, se empleó el sistema de electroforesis *Mini-PROTEAN* de BioRad (**Figura 4.20**), en conjunto con una fuente de alimentación PowerPac™ de BioRad, que permite generar un campo eléctrico mediante dos electrodos: el electrodo negativo o cátodo y el electrodo positivo o ánodo. El tampón de electroforesis utilizado para mantener el campo eléctrico consta de 25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina y 0.1% de SDS a pH 8.3.

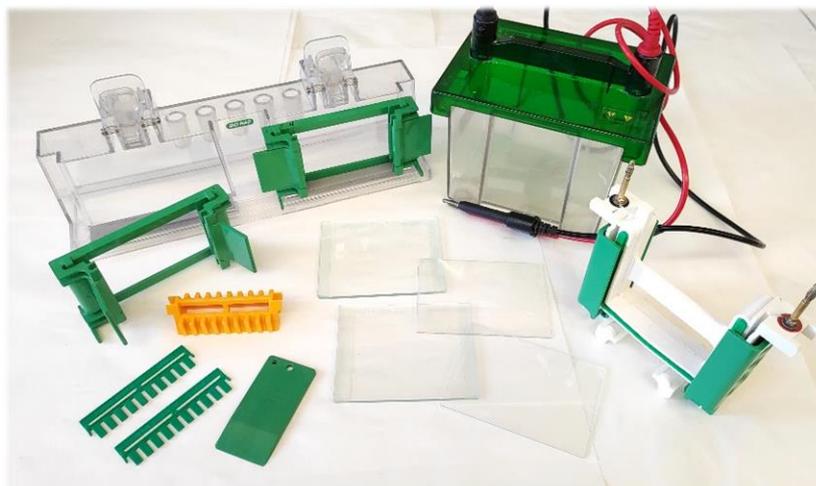


Figura 4.20. Sistema de electroforesis *Mini-PROTEAN* de BioRad. Imagen tomada en nuestro laboratorio.

La SDS-PAGE es conocida por su alta resolución, que se logra mediante el uso de un sistema electroforético discontinuo compuesto por dos geles con diferente porosidad y pH. El gel superior, conocido como gel concentrador, condensa las muestras, que luego se separan en el gel inferior, denominado gel separador. La movilidad en el gel separador está restringida por el tamaño de los poros, el cual depende de la concentración de monómeros en el gel. La selección del tamaño del poro en los geles separadores utilizados en esta Tesis Doctoral se determinó en función del tamaño de las proteínas a separar, y esto fue logrado mediante diferentes proporciones de acrilamida/bisacrilamida. Los geles separadores preparados oscilaron entre 7-15% (p/v) de acrilamida/bisacrilamida. La mezcla de acrilamida/bisacrilamida se disolvió en un tampón compuesto por Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8 y 1% de SDS. Una vez que el gel separador polimerizó, se agregó el gel concentrador. El gel concentrador se preparó al 10% de acrilamida/bisacrilamida en un tampón Tris-HCl 0.5 M a pH 6.8 y 1% de SDS. Para la polimerización de los geles, se utilizó una concentración final de 0.5% de persulfato amónico (PSA) y 0.1% de TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletildiamina).

Para cargar las muestras en los geles de electroforesis, estas se mezclaron con un tampón de muestra desnaturizante (SB, *sample buffer*). Este tampón se compone de Tris-HCl 125 mM, glicerol al 10%, SDS al 2%, β -mercaptoetanol al 5%, y azul de bromofenol al 0.01%. La presencia de glicerol en el tampón aumenta la densidad de las muestras, lo que facilita que estas se depositen en el fondo del pocillo del gel durante la carga y evita su difusión. El azul de bromofenol, un colorante de tamaño pequeño, no se retiene en la matriz de poliacrilamida, lo que nos permite visualizar el frente de migración durante el proceso de electroforesis. Además, antes de cargar las muestras

en el gel, estas fueron calentadas a 96°C durante cinco minutos. Asimismo, se utilizó un pocillo del gel para cargar una muestra de marcadores de tamaño pre-teñidos (5 µl) *Precision Plus Protein Dual Color Standards* de BioRad. Estos marcadores de tamaño consisten en una mezcla de proteínas patrón con pesos moleculares conocidos, que abarcan un rango desde 10 hasta 250 kDa, lo que nos permite determinar el peso molecular de las proteínas presentes en nuestra muestra. El proceso de electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 180 voltios durante aproximadamente 45-50 minutos.

Preparación de las muestras a partir de células en cultivo

Primero las células fueron lavadas dos veces con PBS y, a continuación, fueron lisadas y recogidas directamente con tampón de muestra desnaturalizante. Como alternativa, las células podían ser tripsinizadas y lavadas dos veces con PBS mediante centrifugación (1400 rpm durante 4 minutos) y posteriormente, se agregaba el volumen correspondiente de SB. Normalmente se utilizaba una cantidad de 150 µl de SB para cada pocillo en una placa de 6 pocillos. En ambos procedimientos, el último paso consistió en la sonicación de las muestras mediante 3 pulsos de 15 segundos a velocidad 4 utilizando el sonicador *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* de Cole-Parmer. Finalmente, las muestras fueron calentadas a 96°C durante 5 minutos en un termobloque y almacenadas en un congelador a -20°C hasta su uso en los experimentos de electroforesis.

Fraccionamiento celular

La técnica de fraccionamiento celular se emplea para separar y disgregar los distintos compartimentos y orgánulos celulares. Esto permite el estudio y aislamiento de proteínas localizadas en compartimentos específicos, como la membrana, los endosomas, las mitocondrias o el núcleo.

En esta Tesis Doctoral, se utilizó la técnica de fraccionamiento celular con el fin de separar y estudiar la localización citoplasmática o nuclear de diversas proteínas. Para llevar a cabo el procesamiento de las muestras, las células (aproximadamente 10 millones) fueron tripsinizadas, lavadas una vez con PBS mediante centrifugación (1400 rpm, 4 minutos) y lisadas con un tampón de lisis compuesto por Triton-X100 al 0.5%, Tris-Cl a 50 mM y pH 7.5, NaCl a 137.5 mM y glicerol al 10%, complementado con inhibidores de proteasas al 1% (v/v) y fosfatasa al 1% (v/v). Las células fueron incubadas con este tampón de lisis durante 15 minutos en hielo y con agitación ocasional. Posteriormente, se centrifugaron a 16000 × g durante 10 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante resultante corresponde a la fracción citoplásmica,

mientras que el precipitado contiene la fracción nuclear. Este último se disolvió en tampón de Laemmli para obtener una concentración final de 1X. El sobrenadante obtenido se corresponde con la fracción citoplásmica, mientras que el precipitado se disolvió con SB para obtener la fracción nuclear.

4.3.4. WESTERN BLOT

El Western blot es una técnica analítica empleada para la detección específica de proteínas en una mezcla compleja, como puede ser un extracto celular o de tejido. Durante mi Tesis Doctoral esta técnica fue empleada de forma rutinaria, donde las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel y posteriormente se transfirieron desde el gel a una membrana. Una vez en la membrana, se estudiaron las proteínas de interés utilizando anticuerpos específicos.

Inmovilización de proteínas sobre una membrana mediante electrotransferencia

La electrotransferencia es un método que utiliza una corriente eléctrica y un tampón de transferencia para llevar a cabo la transferencia de las proteínas del gel a la membrana. Se puede realizar en húmedo, sumergiendo todos los componentes en una cubeta con tampón, o de forma semi-seca. En esta Tesis Doctoral se utilizó mayoritariamente el sistema *Mini Trans Blot Cell* de BioRad, que es un sistema en húmedo (**Figura 4.21**). El tampón de transferencia empleado contenía Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.01% y metanol 10%, el cual ayuda a fijar las proteínas a la membrana.

Entre las membranas más utilizadas para la inmovilización de proteínas destacan las de nitrocelulosa y las de PVDF (fluoruro de polivinilideno), cuyo tamaño de poro puede ser variable. Para esta Tesis Doctoral se utilizaron membranas de nitrocelulosa con tamaño de poro de 0.2 μm procedentes de *Amherham Protran* (GE Healthcare Life Sciences).

El sistema *Mini Trans-Blot Cell* consta de dos casetes en los que se colocan los elementos de transferencia. El protocolo utilizado mantenía el siguiente orden, empezando por la placa oscura del casete: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro y esponja (**Figura 4.21**). Todos los elementos se ensamblaron en estado húmedo, sumergiéndolos en una bandeja con tampón de transferencia. La membrana fue hidratada previamente con agua destilada (5 minutos) y tampón de transferencia (otros 5 minutos). Se eliminaron las burbujas de aire entre los elementos para mejorar la transferencia. El casete se cerró con el sistema de pinza y se colocó junto a su casete compañero en una pieza de sujeción en la orientación adecuada. Se colocó una placa

refrigerante en la cubeta para disipar el calor generado durante la transferencia. Se agregaron 800 ml de tampón de transferencia en la cubeta, se colocó la tapa y se conectó a la fuente de corriente. La transferencia se programó durante 1 hora a 100 voltios (amperaje constante a 300 mA).

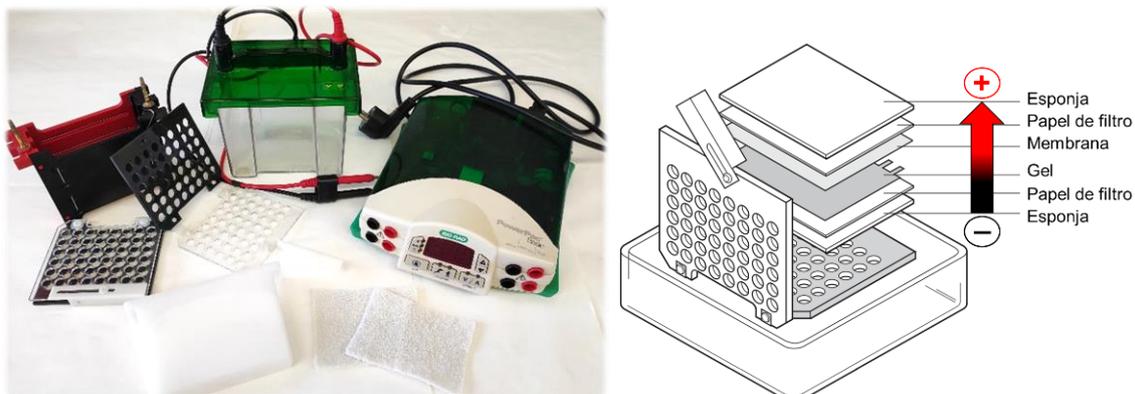


Figura 4.21. Componentes del sistema empleado para realizar la técnica de Western blot (izquierda) y sentido de migración de las proteínas desde el gel hacia la membrana (derecha). La imagen con los accesorios del sistema (izquierda) ha sido tomada en nuestro laboratorio, mientras que la imagen que representa el orden de los elementos de transferencia en el casete y la migración de las proteínas desde el gel hasta la membrana debido a la aplicación de un campo eléctrico (derecha) ha sido adaptada del protocolo *Mini Trans Blot Cell* de BioRad.

Durante la etapa de transferencia, las proteínas del gel cargadas negativamente migraron hacia el ánodo y se inmovilizaron en la membrana. Una vez finalizada esta etapa, se desmontó el sistema y se observó que los marcadores pre-teñidos no estaban presentes en el gel, lo cual indicaba que las proteínas se habían transferido a la membrana. Para asegurarnos, se llevó a cabo la tinción de la membrana con rojo Ponceau (Ponceau-S 0.1% en ácido acético 1%) durante 3 minutos, la cual nos permitió visualizar en la membrana unas bandas discretas teñidas de rojo correspondientes a las proteínas de las muestras empleadas. El rojo Ponceau es un colorante reversible que no interfiere en la unión posterior de las proteínas con el anticuerpo ni en la detección de la actividad enzimática.

Bloqueo de las uniones inespecíficas de la membrana

El proceso de bloqueo de la membrana se basa en saturar los sitios de unión de proteínas disponibles en la membrana que no han sido ocupados por las propias proteínas de la muestra, con el fin de prevenir la unión no específica de los anticuerpos a estos sitios. Para lograrlo, la membrana se incubó a temperatura ambiente con una solución de bloqueo durante 1-2 horas, con una suave agitación. Las soluciones de bloqueo utilizadas fueron leche desnatada en polvo al 5% en PBS-Tween (PBS-T) y

BSA al 3% en PBS-T. El PBS-T es un tampón PBS al que se le ha añadido el detergente Tween-20 al 0.1%.

Incubación con el anticuerpo primario

Se prepararon diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios utilizando la misma solución que se utilizó para el bloqueo, ya sea leche o BSA. La incubación con el anticuerpo primario se llevó a cabo durante toda la noche a 4°C, con una suave agitación. Después de la incubación, se realizaron dos lavados de 5 minutos con PBS-T a temperatura ambiente para descartar el anticuerpo no unido.

Incubación con el anticuerpo secundario

Se emplearon anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, de conejo o de rata, dependiendo del origen del anticuerpo primario. Estos anticuerpos secundarios estaban conjugados con la enzima peroxidasa de rábano o HRP (*horseradish peroxidase*). La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas, con una suave agitación. Después de la incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS-T para descartar el anticuerpo no unido.

Revelado de la actividad peroxidasa

Para detectar la actividad de la peroxidasa, se utilizó la solución reveladora *WesternBright ECL HRP substrate* de Advansta. Esta solución contiene un sustrato de peroxidasa que genera una reacción quimioluminiscente, la cual puede ser detectada mediante un dispositivo de análisis de imagen (**Figura 4.22**). Para preparar la solución de revelado, se mezclaron y homogeneizaron los volúmenes necesarios de los dos reactivos del kit en proporción 1:1. La membrana se colocó en una superficie plana y se cubrió con esta solución durante 2 minutos. El luminol presente en la solución de revelado se oxida por la peroxidasa, generando ésteres de acridinio que emiten luz con una longitud de onda máxima de 425 nm. La emisión de luz o señal de quimioluminiscencia fue capturada utilizando el dispositivo de análisis de imagen *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* de BioRad. Posteriormente, las bandas de proteínas reveladas fueron analizadas utilizando los programas informáticos *Image Lab* (BioRad) y *Gel-Pro Analyzer* (Media Cybernetics Inc., Rockville, MD, USA) mediante densitometría de imagen.

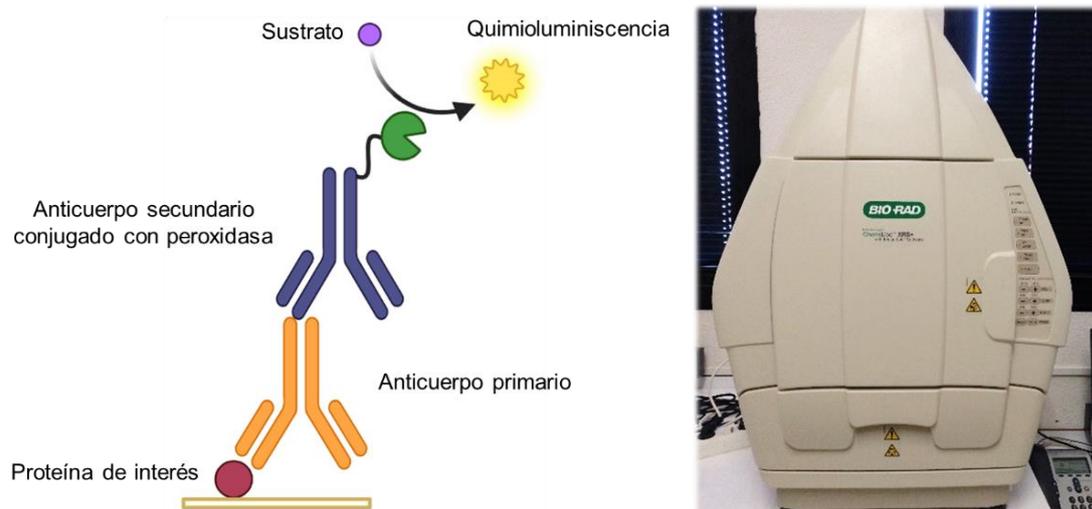


Figura 4.22. Revelado mediante quimioluminiscencia. La imagen del diagrama de revelado de la actividad peroxidasa (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen del dispositivo *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* de BioRad (derecha) ha sido tomada en nuestro laboratorio.

Stripping

En ocasiones, se reutilizaron las membranas para la tinción con un nuevo anticuerpo utilizando la técnica de *stripping*. Para ello, las membranas fueron incubadas con tampón de *stripping* durante 30 minutos a 50°C y agitando cada 5 minutos. Este tampón estaba compuesto por una disolución de Tris-HCl 62.5 mM (pH 6.8), β -mercaptoetanol 100 mM y SDS al 2%. Después de la incubación, se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T. Una vez completado este procedimiento, la membrana quedó libre de anticuerpo unido y de nuevo pudo ser bloqueada con leche o BSA e incubada con un nuevo anticuerpo.

4.3.5. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

La inmunoprecipitación es un método para aislar y concentrar una determinada proteína a partir de una mezcla compleja. Consiste en precipitar la proteína de interés que se encuentra en solución utilizando un anticuerpo específico contra ella. El anticuerpo se une a un soporte sólido, como microesferas, que permiten la recuperación de los complejos formados por el antígeno y el anticuerpo. Algunas microesferas son magnéticas y se pueden recuperar con un imán, mientras que otras están compuestas de sefarosa y se pueden recuperar mediante centrifugación.

En esta Tesis Doctoral, se utilizaron principalmente microesferas magnéticas recubiertas con proteína G, *PureProteome Protein G Magnetic Beads* de Merck Millipore (**Figura 4.23**). Para realizar la técnica, se comenzó con una suspensión celular con un

recuento aproximado de unas 5×10^6 células. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS frío, centrifugando a $200 \times g$ durante 5 minutos. Después del último lavado, el precipitado fue resuspendido con 500 μ l de un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 8, 180 mM NaCl, NP40 0.4%) al cual se le añadieron inhibidores enzimáticos como inhibidores de proteasas, fosfatasas, demetilinas y desacetilasas con el fin de preservar las modificaciones postraduccionales de la proteína de interés. Las células se incubaron con el tampón de lisis durante 10-15 minutos en hielo, agitando en vórtex cada 1-2 minutos. Los lisados se centrifugaron a $20000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C para sedimentar los restos celulares. Se tomó una alícuota del sobrenadante, que contiene las proteínas, para cuantificarlas mediante la técnica de Bradford. Una vez evaluada la concentración de proteína, se cogió el volumen de sobrenadante correspondiente a 1 mg de proteína y se diluyó con tampón de dilución. Por cada 500 μ l de sobrenadante se agregaron 500 μ l de tampón de dilución (Tris-HCl 50 mM pH 8, 2.5 mM CaCl_2 , NP40 0.4%) suplementado con inhibidores enzimáticos y ADNasa I. El tampón de dilución reduce la concentración de NaCl y ayuda a la unión del anticuerpo, y la ADNasa clarifica la muestra al eliminar el ADN que podría obstruir los sitios de unión del anticuerpo en las microesferas magnéticas. Una vez diluida la muestra con nuestra proteína de interés se llevó a cabo una etapa de lavado o *pre-clearing* con el fin de descartar todo aquello que se unía inespecíficamente a las microesferas. Para ello, se realizó una incubación de la muestra con 50 μ l de la suspensión de microesferas (lavadas) durante 2 horas a 4°C en rotación giratoria y se cogió de nuevo el sobrenadante con ayuda de una gradilla magnética. Posteriormente, se agregó el anticuerpo primario a la muestra y se incubó a 4°C durante toda la noche en una rueda giratoria para permitir la formación de los complejos antígeno-anticuerpo.

Las microesferas magnéticas se prepararon utilizando 100 μ l de la suspensión de microesferas para cada muestra (50 μ l para el *pre-clearing* y 50 μ l para la incubación con el complejo antígeno-anticuerpo). Se depositaron en un tubo de 1.5 ml que se colocó en una gradilla magnética para eliminar el medio de almacenamiento. Posteriormente, se lavaron las microesferas dos veces durante 5 minutos con 500 μ l de PBS-T, con agitación suave en vórtex cada 1-2 minutos.

Una vez lavadas las microesferas magnéticas e incubado el anticuerpo primario con la muestra durante toda la noche, se realizó la incubación de estas microesferas con la muestra que contiene los complejos antígeno-anticuerpo, durante 1-2 horas a 4°C con agitación en la rueda giratoria. Luego, los tubos se volvieron a colocar en la gradilla para eliminar la fracción no unida. Se realizaron tres lavados de las microesferas durante 2 minutos cada uno, utilizando 1 ml de PBS-T y en agitación en la rueda giratoria. Por

último, después de eliminar el último lavado, se eluyó la proteína añadiendo 50 μ l de un tampón de muestra desnaturizante y se calentó a 90°C durante 10 minutos en un termobloque, agitando cada 2 minutos. Los tubos se colocaron en la gradilla magnética para retener las microesferas y toda la muestra se transfirió a un nuevo tubo.

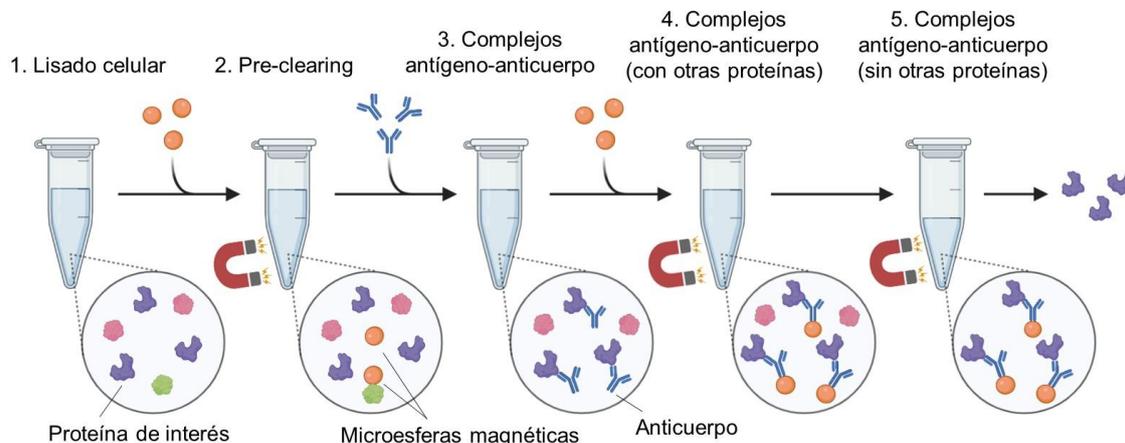


Figura 4.23. Diagrama del proceso de inmunoprecipitación indirecta con microesferas magnéticas de proteína G. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.3.6. CENTRIFUGACIÓN

La separación de partículas normalmente se lleva a cabo mediante el uso de una fuerza centrífuga (**Figura 4.24**). Se emplean dos técnicas principales: la centrifugación diferencial y la centrifugación en gradiente de densidad. Mientras que la centrifugación diferencial se utiliza para obtener un sobrenadante y un material precipitado, la centrifugación en gradiente de densidad se caracteriza por distribuir las partículas en fracciones de diferentes densidades de un fluido líquido. Dentro de la técnica que utiliza un gradiente de densidad, se distingue la centrifugación de velocidad zonal y la centrifugación isopícnica.



Figura 4.24. Aparatos de centrifugación. Centrífuga Heraeus Multifuge 3SR+ (izquierda) y microcentrífuga Hettich mikro 200R (derecha). Imágenes tomadas en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

4.3.6.1. Separación de células mononucleares por centrifugación isopícnica

En la centrifugación isopícnica, la separación de partículas se basa exclusivamente en su densidad. El tamaño de las partículas solo afecta a la velocidad a la que se desplazan hasta que su densidad se iguala a la del medio de gradiente empleado. Las partículas se desplazan en el gradiente hasta que llegan a la región donde la densidad de éstas y la del gradiente son idénticas. En esta Tesis Doctoral se utilizó la técnica de centrifugación isopícnica para la separación de las células mononucleares (**Figura 4.25**) y el posterior aislamiento de células NK de ratón a partir de los bazos de ratones C57BL/6 o atímicos.

Los bazos fueron disociados mecánicamente y las células mononucleares se separaron utilizando la técnica de centrifugación en gradiente de densidad con *Histopaque-1077* (Sigma-Aldrich), una solución de polisacárido y diatrizoato de sodio ajustada a una densidad de 1.077 g/ml. Se utilizaron dos bazos de cada condición experimental para obtener una suspensión celular en un volumen final de 3 ml. Para llevar a cabo la separación celular de cada muestra, se añadieron 3 ml de *Histopaque-1077* en un tubo cónico de centrifugación de 15 ml. A continuación, se agregó cuidadosamente la suspensión celular obtenida a partir de los bazos, de manera que se distinguieran dos capas bien diferenciadas. El tubo se centrifugó a una velocidad de 400 × g durante 30 minutos a temperatura ambiente. Es muy importante que la velocidad de frenado y aceleración de la centrífuga se ajusten al nivel más bajo, ya que un frenado o aceleración bruscos pueden afectar la separación de las capas. Después de la centrifugación, se descartó cuidadosamente la capa superior con una pipeta Pasteur hasta aproximadamente 0.5 cm de la interfaz opaca que contiene las células mononucleares. Seguidamente, se transfirió con cuidado la interfaz opaca con las células de interés a otro tubo cónico de centrifugación limpio utilizando una pipeta Pasteur. Estas células se lavaron con 10 ml de PBS mediante centrifugación a 250 × g durante 10 minutos. El precipitado celular se resuspendió en 5 ml de PBS y se volvió a centrifugar a 250 × g durante 10 minutos. Transcurrido el tiempo, se repitió el último proceso de lavado. Finalmente, se descartó el sobrenadante y el precipitado de células fue resuspendido en 0.5 ml de medio de cultivo completo.

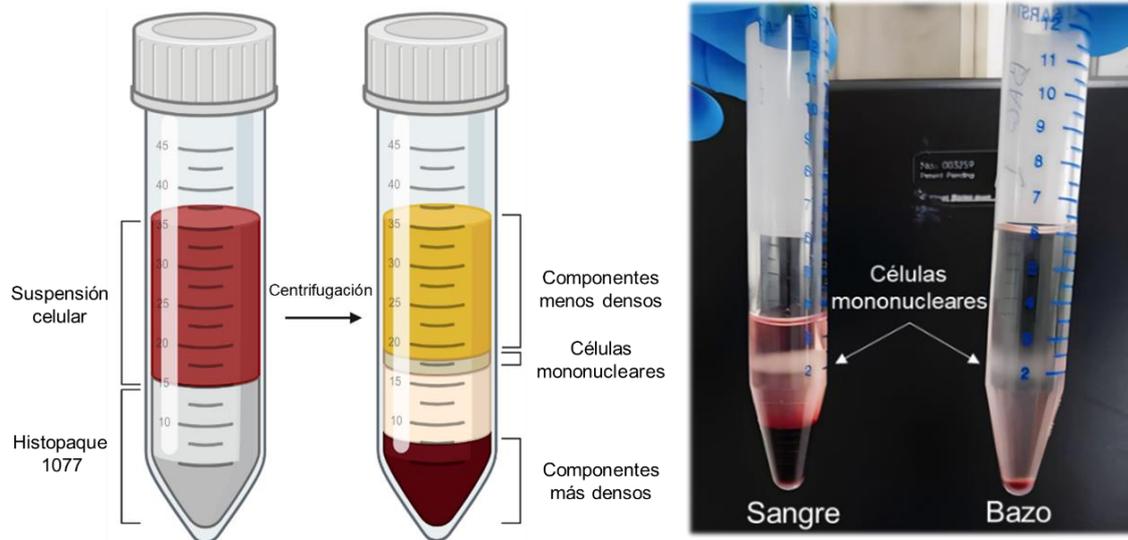


Figura 4.25. Separación de los componentes de una suspensión celular según su densidad mediante la solución de *Histopaque-1077*. La imagen del esquema del proceso de separación (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen que muestra el resultado (derecha) ha sido tomada en nuestro laboratorio.

4.3.7. AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK

Una vez separadas las células mononucleares mediante centrifugación isopícnica, se utilizó el kit *Mouse NK Cell Isolation II* de Miltenyi Biotec (#130-096-892) para aislar las células NK de ratón mediante selección negativa por MACS (*magnetic activated cell sorting*).

Este kit utiliza un sistema de marcaje magnético indirecto para aislar células NK intactas a partir de suspensiones de células de bazo, hígado y ganglios linfáticos de ratón. Las células que no son de interés (células no NK), como las células T, células dendríticas, células B, granulocitos, macrófagos y células eritroides, fueron marcadas magnéticamente de forma indirecta mediante un cóctel de anticuerpos conjugados con biotina y microesferas magnéticas anti-biotina. El aislamiento de células NK no marcadas de alta pureza se logró mediante la eliminación de las células marcadas magnéticamente.

Primero se determinó el número de células de la suspensión celular obtenida tras la centrifugación isopícnica y se cogió una alícuota de 2×10^5 células para su posterior evaluación por citometría de flujo. La suspensión celular restante se centrifugó a $300 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió añadiendo $40 \mu\text{l}$ por cada 10^7 de células totales con tampón de dilución (0.5% BSA, 2 mM EDTA, pH 7.2 en PBS). A continuación, se agregaron 10

μl de un cóctel de anticuerpos conjugados con biotina para células NK por cada 10^7 de células. La mezcla se incubó durante 5 minutos a 4°C . Posteriormente, se lavaron las células añadiendo 2 ml de tampón de dilución por cada 10^7 de células y se centrifugaron a $300 \times g$ durante 10 minutos a temperatura ambiente para eliminar el sobrenadante. Seguidamente, se añadieron 80 μl de tampón de dilución junto con 20 μl de microesferas magnéticas conjugadas con un anticuerpo monoclonal anti-biotina, por cada 10^7 de células. Esta mezcla se incubó durante 10 minutos a 4°C . Luego, se procedió a la separación magnética utilizando columnas MS en un campo magnético creado por el sistema *MiniMACS Separator*. Para ello, se vertió la mezcla con la suspensión celular en la columna y se añadieron 500 μl de tampón de dilución para recoger el eluido que contenía las células no marcadas, que representan las células NK enriquecidas. Finalmente, se realizó un lavado adicional de la columna MS con otros 500 μl de tampón de dilución para recoger las células no marcadas restantes y se combinaron con el flujo del paso anterior.

Para confirmar la correcta purificación de las células NK, se cogió una alícuota de la suspensión final (2×10^5 células) y junto con la alícuota que cogimos antes de iniciar el proceso de aislamiento, las células NK se marcaron con un anticuerpo de membrana específico (anti-NKp46) y se analizaron mediante citometría de flujo (**Figura 4.26**).

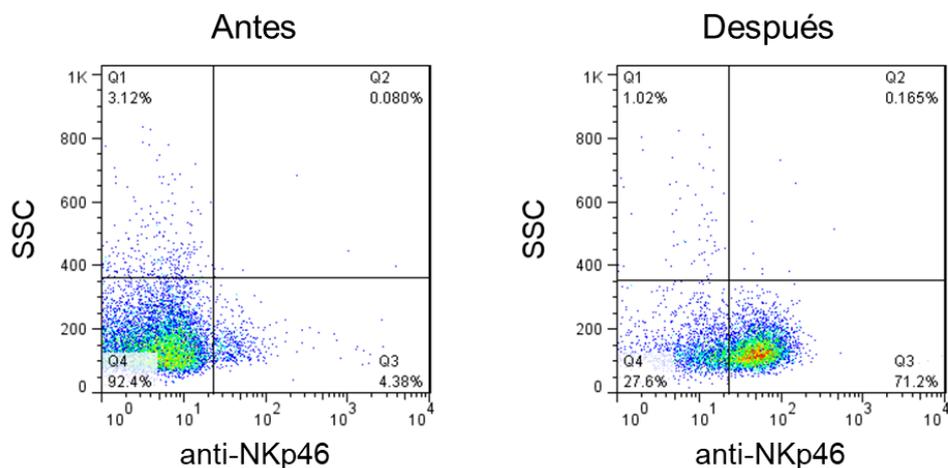


Figura 4.26. Análisis por citometría de flujo de la población de células NK antes y después de la purificación. SSC: dispersión lateral de la luz. Imágenes elaboradas a partir de los resultados obtenidos durante el proceso de purificación.

4.3.8. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

La espectrofotometría es una técnica para medir la cantidad de energía radiante absorbida por un analito en disolución cuando se expone a una radiación electromagnética de longitud de onda específica. En la espectrofotometría ultravioleta-

visible (UV-VIS), se utiliza radiación incidente en las regiones “Ultravioleta cercano”, “Visible” e “Infrarrojo” del espectro electromagnético, que abarca desde 200 a 800 nm.

La absorción es el proceso en el que la energía de los fotones se transfiere a las partículas de materia. Como resultado, la intensidad de la radiación de un haz de luz disminuye después de pasar a través de la muestra en comparación con la intensidad inicial antes de incidir en la muestra. Esta reducción en la intensidad se expresa mediante la transmitancia (T), que es la fracción de la intensidad de luz transmitida en relación con la intensidad incidente. Además, la transmitancia se relaciona con la absorbancia (A) mediante la ecuación $A = -\log(T)$. En general, se trabaja con absorbancia, ya que a una longitud de onda específica está relacionada de forma lineal con la concentración del analito en disolución a través de la Ley de Lambert-Beer:

$$A = c \cdot \varepsilon \cdot L$$

Donde c representa la concentración en unidades de molaridad (M), ε es el coeficiente de extinción molar en unidades de $M^{-1}cm^{-1}$ (característico de cada analito o cromóforo) y L es el espesor óptico en centímetros. Esta fórmula nos permite calcular la concentración de un analito si conocemos su coeficiente de extinción molar y el espesor de la muestra utilizada. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la Ley de Lambert-Beer solo es válida para disoluciones diluidas, ya que la linealidad entre la absorbancia y la concentración solo se mantiene dentro de un rango de concentración determinado. Concentraciones elevadas pueden dar lugar a fenómenos como dispersión de luz, agregación de moléculas, etc., que afectan a la relación de proporcionalidad.

En esta Tesis Doctoral, se empleó la espectrofotometría UV-VIS en diversos ensayos, como MTT, ELISA para evaluar apoptosis, ensayos de actividad de PP2A, cuantificación de los niveles de SAM y SAH, cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford, cuantificación de ácidos nucleicos y cuantificación de la entrada de glucosa a la célula. En todos los casos, excepto para la cuantificación de ácidos nucleicos, se determinó la absorbancia utilizando un lector de placas. Estos lectores de placas son instrumentos capaces de medir diferentes magnitudes en cada uno de los pocillos de una placa de microtitulación (**Figura 4.27**). El formato más comúnmente utilizado es el de 96 pocillos. Los lectores de placas utilizados fueron el *FLUOstar Omega* de BMG LabTech, el *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices y el *Model 680* de BioRad. Para la cuantificación de ácidos nucleicos se utilizó el espectrofotómetro de microvolumen *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific, según se describe en el apartado 4.4.3. ANÁLISIS DE CANTIDAD Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS.



Figura 4.27. Lectores de placas *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices (izquierda) y *FLUOstar Omega* de BMG LabTech (derecha). Imágenes tomadas en nuestro laboratorio y en la Sección de Cultivo de Tejidos de la UM.

4.3.9. ENSAYOS ELISA

El ensayo ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) es una técnica de laboratorio ampliamente utilizada para detectar y cuantificar la presencia de una sustancia específica, como un antígeno o un anticuerpo, en una muestra biológica.

El principio básico del ensayo ELISA consiste en la interacción entre un anticuerpo específico y su antígeno correspondiente. Se caracterizan por ser ensayos altamente sensibles y específicos, así como versátiles, precisos y capaces de procesar múltiples muestras, lo que los convierten en herramientas fundamentales en diversas aplicaciones científicas y médicas.

Los principales tipos de ensayos ELISA incluyen el directo, el indirecto, el de captura o “sándwich” y el competitivo. El ELISA directo involucra la inmovilización de un anticuerpo en la superficie de una placa, seguido de la detección directa del antígeno de interés utilizando un anticuerpo secundario conjugado a una enzima. En el ELISA indirecto, se utiliza un anticuerpo primario para capturar el antígeno, y luego se detecta mediante un anticuerpo secundario que reconoce al anticuerpo primario y está conjugado a una enzima. El ELISA de captura o “sándwich” involucra la utilización de un par de anticuerpos, uno para capturar el antígeno y otro para detectarlo, formando un "sándwich" en torno al antígeno. Y en el ELISA competitivo se sigue una estrategia en la que se inmoviliza el mismo antígeno de interés presente en la muestra sobre la superficie de un pocillo.

En esta Tesis Doctoral se ha utilizado el método de ELISA para evaluar diferentes parámetros como la apoptosis, descrita anteriormente (apartado 4.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA), así como la cuantificación de SAM, SAH y MIC-A/B.

4.3.9.1. Cuantificación de SAM y SAH

Para la determinación de los niveles de SAM y SAH intracelulares, se empleó el *SAM and SAH ELISA Combo Kit* de Cell Biolabs, atendiendo a las instrucciones del protocolo proporcionado. Este kit utiliza un formato de ensayo ELISA competitivo (**Figura 4.28**), en el cual se emplean anticuerpos primarios específicos que reconocen tanto SAM como SAH, así como anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa.

Los ensayos ELISA competitivos son muy utilizados para cuantificar antígenos presentes en bajas concentraciones, como por ejemplo SAM o SAH. Primero se inmoviliza sobre la superficie del pocillo el mismo antígeno de interés que contiene la muestra. A continuación, se agregan la muestra y el anticuerpo correspondiente, y si la muestra contiene un antígeno específico, este compite con el antígeno de referencia por la unión al anticuerpo. Posteriormente, se realiza una nueva incubación con un anticuerpo secundario que está conjugado con peroxidasa. Después de los lavados, se eliminan los componentes no unidos y se mide la señal por absorbancia. A medida que aumenta la cantidad de antígeno en la muestra, menos anticuerpo se une al fondo de los pocillos a través del antígeno de referencia, lo que resulta en una disminución de la señal detectada. En definitiva, en un ELISA competitivo, la presencia de mayor cantidad de antígeno en la muestra se traduce en una menor señal generada, ya que compite con el antígeno de referencia por la unión al anticuerpo.

En la preparación de las muestras, los lisados celulares correspondientes a cada una de las condiciones experimentales fueron sonicados en frío mediante 3 ciclos de 20 segundos de duración cada uno, utilizando el sonicador *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* de Cole-Parmer con una amplitud del 40%, dejando 1 minuto de descanso entre cada ciclo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10000 × g durante 15 minutos a 4°C, y se recogieron los sobrenadantes.

Para llevar a cabo el ensayo, se recubrieron los pocillos de una placa de 96 pocillos con conjugados de SAM-BSA o SAH-BSA diluidos en PBS y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se bloquearon las uniones inespecíficas añadiendo 100 µl del diluyente de ensayo a cada pocillo a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras realizar el bloqueo de la placa, se eliminó el diluyente de ensayo de cada pocillo y se agregaron 50 µl de muestra a los pocillos de interés. Para los pocillos designados como blanco, se añadieron 50 µl de PBS. En los pocillos que se utilizaron para establecer la recta patrón, se agregaron 50 µl de cada una de las diluciones preparadas a partir de las soluciones de concentración conocida de SAM-BSA o SAH-BSA. A continuación, se añadieron 50 µl de la solución de anticuerpo primario anti-SAM o anti-SAH a cada

pocillo, y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación orbital. Luego, se realizaron tres lavados con tampón de lavado y se agregaron 100 μ l de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a cada pocillo durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital. Después de esta incubación, se lavaron los pocillos y se añadieron 100 μ l de la solución de sustrato a cada pocillo durante 2-30 minutos a temperatura ambiente con agitación hasta que se observó la aparición de color. La reacción se detuvo con 100 μ l de solución de parada y se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm utilizando el lector de placas *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices. Los resultados se presentaron como concentraciones relativas mediante interpolación utilizando una recta patrón o normalizados con respecto a una muestra no tratada.

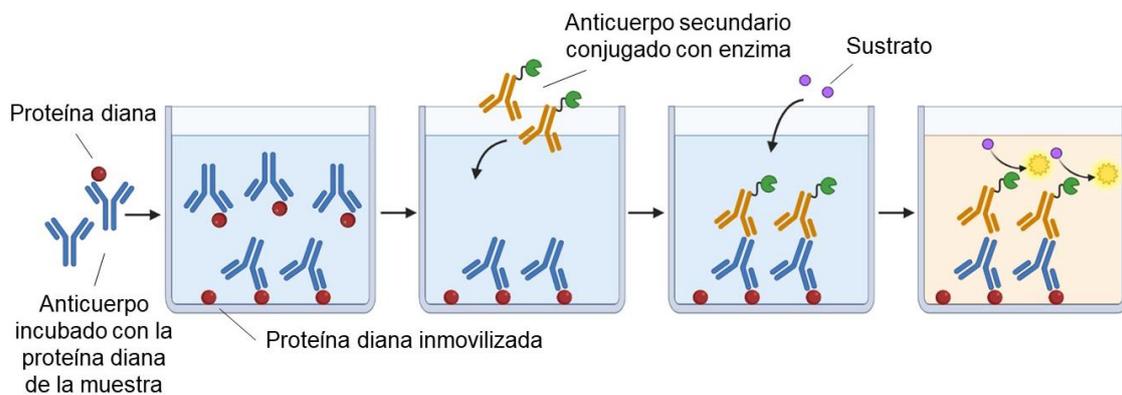


Figura 4.28. Diagrama de un ensayo ELISA de tipo competitivo. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.3.9.2. Cuantificación MIC-A/B

Para la cuantificación de los niveles de MIC-A y MIC-B, se emplearon los kits comerciales *MICA Human ELISA* (#BMS2302) y *MICB Human ELISA* (#BMS2303) de Thermo Scientific, respectivamente. La determinación de estas moléculas se realizó siguiendo los pasos del protocolo correspondiente, basado en un ELISA de captura o tipo "sándwich" (**Figura 4.29**).

En este formato de ELISA, se emplean dos anticuerpos específicos que reconocen diferentes epítopos en el antígeno de interés. El primer anticuerpo, conocido como anticuerpo de captura, se une al fondo del pocillo de la microplaca, dirigido hacia uno de los epítopos del antígeno. Por otro lado, el segundo anticuerpo, denominado anticuerpo de detección, se une a un epítipo distinto del antígeno y está conjugado a una enzima que facilita su detección. De esta manera, mediante la interacción entre los anticuerpos y los epítopos del antígeno, se establece un "sándwich" que permite la detección del antígeno en cuestión. Después de los pasos de incubación y lavado para eliminar las

sustancias no unidas en la microplaca, se agrega una solución de sustrato que reacciona con el complejo enzima-anticuerpo-antígeno, generando una señal de absorbancia medible. La intensidad de esta señal está directamente relacionada con la concentración del antígeno de interés presente en la muestra.

Para llevar a cabo este ensayo, se deben considerar las muestras de interés, así como los blancos y estándares necesarios. Primero, las tiras de micropocillos se lavaron dos veces con tampón de lavado, aspirando el contenido entre lavados. Después del lavado final, se añadieron 50 μl de diluyente a todas las tiras junto con 50 μl de muestra, de PBS para los blancos y de disolución estándar a los micropocillos correspondientes, los cuales fueron cubiertos con una película adhesiva e incubados a temperatura ambiente durante 2 horas en un agitador de microplacas. A continuación, se lavaron los micropocillos nuevamente y se agregaron 100 μl del conjugado de biotina a todos los pocillos. Después de una incubación de 1 hora, se lavaron las tiras de micropocillos nuevamente y se añadieron 100 μl del conjugado estreptavidina-HRP a todos los pocillos durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se lavaron los micropocillos para eliminar las sustancias no unidas y se pipetearon 100 μl de solución de sustrato TMB a todos los pocillos. Se incubaron durante 2-30 minutos a temperatura ambiente con agitación hasta que se observó color. En ese momento, se agregaron 100 μl de solución de parada y se procedió a la lectura de la absorbancia a 450 nm empleando el lector de placas *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices. Los resultados se presentaron como concentraciones relativas mediante interpolación utilizando una curva estándar o normalizados con respecto a una muestra control.

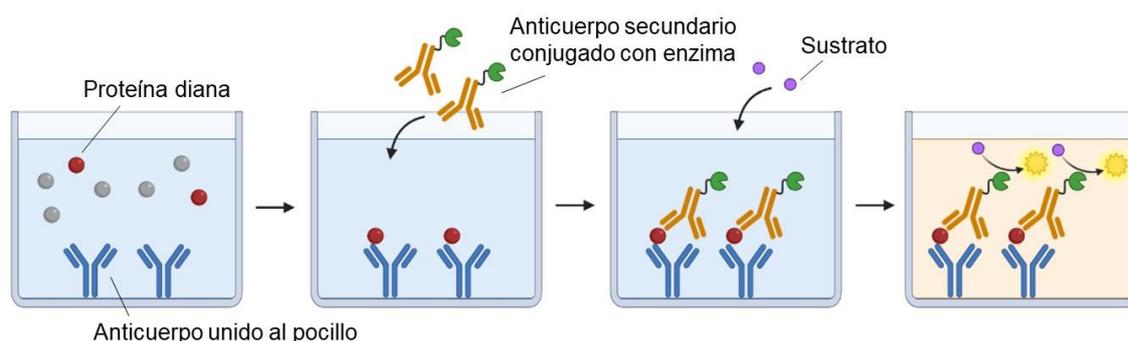


Figura 4.29. Diagrama de un ensayo ELISA de tipo sándwich. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA DE PP2A

La medida de la actividad fosfatasa de PP2A se realizó con el kit comercial *PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay* de Merck Millipore. Este kit consiste en la determinación del fosfato inorgánico liberado por la acción de la PP2A que contienen

las muestras sobre un fosfopéptido sintético que presenta una treonina fosforilada. El fosfato liberado reacciona con el reactivo verde de malaquita, generando un compuesto de color verde cuya absorbancia se mide a 630 nm. Para cuantificar la actividad de la PP2A en las muestras, se preparó una curva estándar utilizando concentraciones conocidas de fosfato inorgánico, lo que permitió determinar la concentración de fosfato presente en las muestras de interés.

Antes de iniciar el ensayo, se realizaron medidas para asegurar la ausencia de contaminación por fosfato en todos los reactivos. Para ello, se empleó agua Milli-Q para preparar el tampón de extracción y la solución salina tamponada con Tris (TBS, *Tris buffered saline*) como tampón de lavado. Además, se tomaron pequeñas muestras de cada reactivo y se mezclaron con 100 μ l de solución de trabajo verde de malaquita para verificar la ausencia de cambio de color hacia verde.

Preparación de las disoluciones de verde de malaquita y fosfopéptido

La solución de trabajo verde de malaquita (solución AB) se preparó combinando 10 μ l de la solución B (aditivo) por cada 1 ml de la solución A (verde de malaquita). Por otro lado, la disolución del fosfopéptido K-R-pT-I-R-R se preparó disolviendo 1 mg del péptido en 1.1 ml de agua destilada, obteniendo así una disolución con una concentración de 1 mM.

Preparación de la curva estándar de fosfato

Se prepararon las diluciones patrón de fosfato inorgánico mediante la mezcla de 125 μ l de la solución de fosfato inorgánico (solución C) con 1125 μ l de agua Milli-Q, obteniendo una disolución madre de fosfato inorgánico con una concentración de 0.1 mM. A partir de esta disolución madre, se prepararon diferentes diluciones que abarcaran un rango de 0 a 2000 picomoles de fosfato en 25 μ l de disolución. Para ello, se prepararon 10 diluciones cogiendo desde 0 a 200 μ l de la disolución madre de fosfato inorgánico 0.1 mM y completando con agua Milli-Q hasta un volumen final de 250 μ l.

Se agregaron 25 μ l de las diluciones a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. En los pocillos designados como blanco se añadieron 25 μ l de agua destilada. Todas las medidas se realizaron por duplicado. Luego, se pipetearon 100 μ l de la solución AB a cada pocillo. La placa se agitó suavemente y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Posteriormente, se midió la absorbancia a 630 nm utilizando un lector de placas. Se calculó la media de cada par de valores obtenidos y se restó el valor del blanco. Se realizó una curva estándar utilizando los picomoles de fosfato en el eje de abscisas y la absorbancia en el eje de ordenadas.

Preparación de las muestras

Se cultivaron las células en frascos y se sometieron a determinados tratamientos durante el tiempo requerido. En el día del ensayo, se procesaron las muestras con el cuidado necesario para minimizar la contaminación por fosfato inorgánico. Para ello, los frascos se lavaron dos veces con una solución de NaCl al 0.9% en agua. Posteriormente, se agregaron 500 µl de un tampón de extracción compuesto por Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), NaCl 250 mM, EDTA 3 mM, EGTA 3 mM, Triton-X100 al 1% y NP-40 al 0.5%, sin inhibidores de fosfatasas.

Los extractos celulares fueron sonicados en hielo durante 4 ciclos de 10 segundos y luego centrifugados a 2000 × g durante 5 minutos. Los sobrenadantes resultantes se recolectaron en viales limpios y estériles, y se guardaron en hielo hasta su uso. Se tomó una muestra de cada sobrenadante y se determinó su concentración de proteína utilizando el método de Bradford.

Inmunoprecipitación de PP2A y ensayo enzimático

De cada lisado celular se cogió un volumen equivalente a 800 µg de proteína y se incubó en un vial junto con 4 µl (4 µg) de anticuerpo anti-PP2A y 30 µl de una suspensión de esferas de agarosa unidas a proteína A. Para alcanzar un volumen final de 500 µl, se añadió el volumen de tampón de ensayo pNPP Ser/Thr correspondiente. Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4°C en una rueda giratoria. Posteriormente, se realizaron 4 lavados, donde las muestras se centrifugaron brevemente para sedimentar la agarosa y se eliminó el sobrenadante, reemplazándolo con nuevo tampón. Los tres primeros lavados se realizaron con 700 µl de TBS y el último lavado con 500 µl tampón de ensayo pNPP Ser/Thr. Después del último lavado, se agregaron 60 µl de dilución de fosfopéptido y 20 µl de tampón de ensayo pNPP Ser/Thr, y se incubó durante 1 hora a 30°C para permitir que la enzima PP2A de las muestras, inmovilizada en las esferas de agarosa, hidrolizara el grupo fosfato del fosfopéptido. Una vez terminada la incubación, se centrifugó brevemente y se transfirieron 25 µl de cada muestra por duplicado a diferentes pocillos de una placa de 96 pocillos. A continuación, se añadieron 100 µl de solución AB a cada pocillo, se agitó suavemente y se incubó durante 15 minutos para permitir la visualización del color verde. La absorbancia se midió a 630 nm utilizando el lector de placas *SpectraMax 340PC384* de Molecular Devices. Se calculó la media de los duplicados y se determinó la concentración de cada muestra utilizando la curva estándar que se realizó previamente.

4.3.11. CUANTIFICACIÓN DE AUTOFAGOSOMAS

La proteína LC3B desempeña un papel esencial en la autofagia. Normalmente, esta proteína se encuentra en el citosol, pero cuando se une al lípido fosfatidiletanolamina, LC3B se asocia con el fagóforo, permitiendo la formación del autofagosoma. Por tanto, esta localización de LC3B se utiliza como un marcador general de las membranas autofágicas.

Los autofagosomas se cuantificaron utilizando el *LC3B Antibody Kit for Autophagy* de Thermo Scientific, cuyo protocolo fue optimizado para microscopía de fluorescencia. Las células fueron tratadas en diferentes condiciones experimentales o en combinación con difosfato de cloroquina (30-100 μ M). El difosfato de cloroquina, utilizado como control positivo, es una sustancia que interrumpe el flujo autofágico normal al afectar el pH lisosomal, lo que provoca la acumulación de autofagosomas. Se utilizó el colorante *CellTrace CFSE* (Thermo Scientific) para teñir de verde las células, ya que atraviesa fácilmente la membrana plasmática y se une de manera covalente a todas las aminas libres en la superficie y el interior de las células. A continuación, estas fueron fijadas con formaldehído al 3.7% en PBS y permeabilizadas con Triton-X100 al 0.2% en PBS, ambos pasos realizados durante 15 minutos a temperatura ambiente. Entre medias, las células fueron lavadas tres veces con PBS. A continuación, las células fueron incubadas con 0.5 μ g/ml del anticuerpo primario anti-LC3B durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar las células con PBS, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo. Para cada muestra, se tomaron imágenes de cinco campos diferentes utilizando un microscopio de fluorescencia. Finalmente, se calculó el número de autofagosomas/100 células.

4.3.12. MEDIDA DE KRAS ACTIVADO

Para evaluar el nivel de activación de la proteína KRAS se utilizaron los kits *Ras Activation Assay* (Cell Biolabs, Inc.) y *Ras Activation ELISA Assay* (Merck Millipore), siguiendo las instrucciones proporcionadas.

En el primer kit se utilizan perlas de agarosa visibles para precipitar selectivamente la forma activa de la proteína KRAS. A continuación, esta pequeña GTPasa precipitada se detecta mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico de la proteína diana. Para realizar el procedimiento, las células fueron lisadas añadiendo 1 ml de tampón de ensayo (25 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2% glicerol) e incubando durante 15 minutos en hielo. Los lisados fueron centrifugados a 14000 \times g durante 10 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante.

Se cogieron 500 μ l de cada muestra y se añadieron 500 μ l de tampón de ensayo para obtener un volumen final de 1 ml. En cada muestra se tomaron dos alícuotas adicionales donde se añadieron los reactivos GTP γ S y GDP como controles positivo y negativo, respectivamente. Luego, se añadieron 40 μ l de la suspensión de microesferas *Raf-1 RBD agarose* a cada tubo. Los tubos se incubaron a 4°C durante 1 hora con agitación suave en una rueda giratoria. Después de la incubación, se precipitaron las microesferas mediante centrifugación durante 10 segundos a 14000 \times g. A continuación, se realizaron tres lavados de las microesferas con 500 μ l de tampón de ensayo, seguidos de centrifugación y aspiración en cada lavado. Después del último lavado, se eliminó todo el sobrenadante con cuidado. El precipitado de microesferas se resuspendió en 50 μ l de tampón de muestra desnaturante. Seguidamente, las muestras se hirvieron a 96°C durante 5 minutos y se centrifugaron durante 10 segundos a 14000 \times g con el fin de eluir la proteína KRAS de las microesferas. De esta forma, se analizó la forma activa de la proteína KRAS mediante Western blot utilizando un anticuerpo primario específico frente a dicha proteína y un anticuerpo conjugado con HRP.

El segundo kit, de tipo ELISA, está diseñado para detectar la presencia de RAS activado. El ensayo se basa en la interacción entre RAS y el dominio de unión a RAS (RBD, *RAS binding domain*) de la quinasa Raf-1, cuando se encuentra en su estado activo unido a GTP (RAS-GTP). Se utiliza un complejo Raf-1-RBD recombinante que se une a los pocillos de una placa ELISA de 96 pocillos recubierta de glutatión. Esto permite capturar específicamente el RAS activo, eliminando el RAS inactivo unido a GDP. El RAS activo capturado se detecta mediante la adición de un anticuerpo específico anti-RAS. La detección se realiza mediante un anticuerpo secundario conjugado con HRP. Las señales se midieron utilizando un lector de placas *FLUOstar Omega* (BMG Labtech).

4.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

4.4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

4.4.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico

Para realizar la extracción y purificación del ADN genómico a partir de células en cultivo se utilizó el kit comercial *Tissue gDNA Isolation* de NZYTech (**Figura 4.30**). Este kit incluye reactivos para la lisis celular y la digestión de proteínas y ARN, así como columnas de purificación con membranas de sílice que retienen el ADN y favorecen la eliminación de impurezas mediante lavados con diferentes tampones. Esta técnica permite hacer estudios de genotipado, PCR, qPCR y secuenciación, entre otros.

Preparación de los lisados

Las células se cultivaron y se sometieron a los tratamientos correspondientes. En el día de la extracción del ADN genómico, las células fueron tratadas con tripsina y se preparó una suspensión de células en 200 μ l de PBS. A cada tubo, que contenía 200 μ l de la suspensión celular, se le agregaron 25 μ l de proteinasa K y 10 μ l de ARNasa A. Los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se añadieron 200 μ l de un tampón de lisis, se agitaron nuevamente y se incubaron a 56°C durante 10-15 minutos para facilitar la digestión de las proteínas y el ARN. Después de la incubación, se agregaron 210 μ l de etanol al 100% para favorecer la unión del ADN a la membrana de la columna de purificación, y los tubos se agitaron en un agitador tipo vórtex durante 5-10 segundos para obtener una solución homogénea.

Unión del ADN a la membrana de purificación

Se utilizó una columna de purificación que se introdujo dentro de un vial estéril de 2 ml. La muestra acumulada hasta ese momento (aproximadamente 650 μ l) se añadió a la columna y los tubos se centrifugaron a 11000 \times g durante 1 minuto a temperatura ambiente. El líquido resultante, junto con el tubo, se descartó, y la columna se transfirió a un nuevo tubo colector.

Lavados del ADN

A cada columna se agregaron 500 μ l de tampón de lavado 1, y los tubos se centrifugaron a 11000 \times g durante 1 minuto a temperatura ambiente. De nuevo, el eluido resultante junto con el tubo se desechó, y la columna se colocó en un tubo colector estéril. Luego, se añadieron 600 μ l de tampón de lavado 2, el cual debe contener etanol,

a cada columna, y los tubos se centrifugaron a $11000 \times g$ durante 1 minuto a temperatura ambiente para eliminar cualquier residuo de etanol de la membrana. El tubo junto con el eluido se descartó, y las columnas se colocaron en un nuevo y limpio tubo de 2 ml.

Elución del ADN

A cada columna se agregaron $50 \mu\text{l}$ de agua ultrapura libre de nucleasas, asegurando que el líquido caía en el centro de la membrana. Los tubos se incubaron durante 1 minuto a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a $11000 \times g$ durante 2 minutos. Los viales de 1.5 ml que contenían el ADN genómico purificado se almacenaron a -20°C hasta su uso.

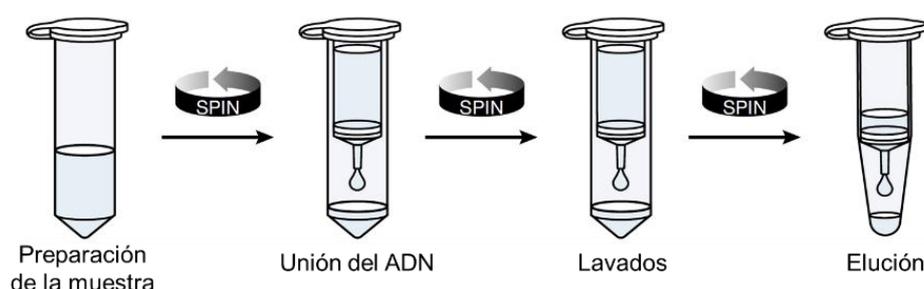


Figura 4.30. Diagrama del proceso de purificación de ADN. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.4.1.2. Extracción y purificación de ARN total

Se empleó el kit comercial *Total RNA Isolation* de NZYTech para la extracción y purificación del ARN total a partir de células en cultivo (**Figura 4.31**), con el objetivo de estudiar los niveles de expresión de determinados genes en los diferentes tratamientos. Este método nos permitió purificar el ARN de cada muestra para su posterior conversión en ADN.

Preparación de los lisados y adición de etanol

Primero se retiró el medio de cultivo de las células sembradas en placas de 6 pocillos y tras un lavado con PBS, se agregaron $350 \mu\text{l}$ de un tampón de lisis y $3.5 \mu\text{l}$ de β -mercaptoetanol a cada pocillo. El lisado celular se recolectó y se añadió sobre una columna de homogeneización que estaba colocada dentro de un tubo colector de 2 ml. Se llevó a cabo una centrifugación de $11000 \times g$ durante 1 minuto y se desechó la columna, ya que el ARN estaba en el eluido resultante. A continuación, se añadieron $350 \mu\text{l}$ de etanol al 70% a cada tubo, con el fin de precipitar los ácidos nucleicos.

Unión del ARN a la membrana de purificación y digestión de ADN

La mezcla se resuspendió bien y se transfirió a una columna de purificación de ARN, la cual estaba insertada en un tubo colector de 2 ml. La centrifugación se realizó a 11000 × g durante 30 segundos, se descartó el volumen eluido y se repitió la operación añadiendo 350 µl de un tampón de unión a la membrana. Tras eliminar el líquido resultante, se añadieron 95 µl de una mezcla de digestión a cada columna con el fin de eliminar el ADN presente en las muestras. Por cada 100 µl de esta mezcla se necesitan 10 µl de ADNasa I y 90 µl de tampón de digestión. Las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Lavados del ARN

Tras la incubación de las muestras con el tampón de digestión, se añadieron 200 µl de tampón de lavado I a la columna y se centrifugó durante 1 minuto a 11000 × g. Se descartó el eluido, se agregaron 600 µl de tampón de lavado II, que debe contener etanol absoluto, y se centrifugó en las mismas condiciones. Luego, se descartó el eluido y se repitió el lavado con 250 µl del tampón de lavado II. Después de desechar el eluido resultante, se centrifugó de nuevo a 11000 × g durante 1 minuto para secar la membrana con el ARN unido. Se descartó el tubo colector y la columna se colocó en un tubo estéril de 1.5 ml.

Elución del ARN

A continuación, se añadieron 40-60 µl de agua libre de ARNasas y se dejó incubar durante 1 minuto. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 11000 × g durante 1 minuto para eluir el ARN que estaba unido a la membrana, y el tubo con el ARN purificado se almacenó a -80°C hasta su uso.

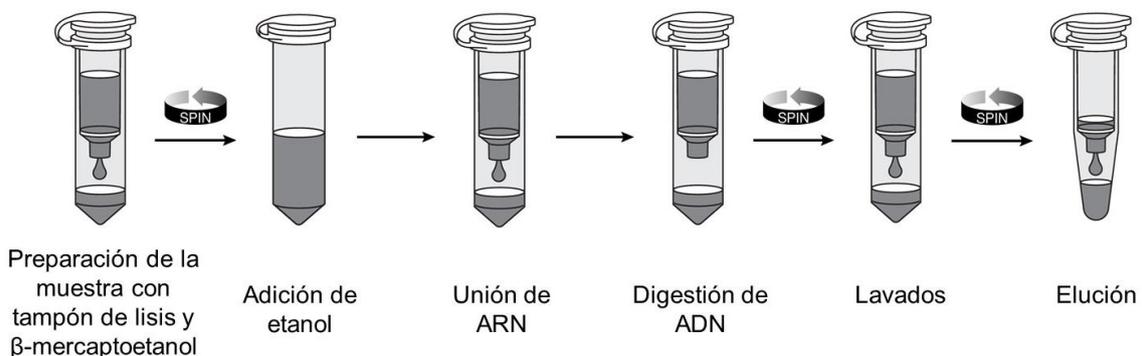


Figura 4.31. Diagrama del proceso de extracción y purificación de ARN total. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción (RT) es un proceso bioquímico mediante el cual se sintetiza una cadena de ADN complementaria a partir de una molécula de ARN de cadena sencilla (**Figura 4.32**). Esta reacción es catalizada por una enzima llamada retrotranscriptasa, que utiliza el ARN como molde para generar el ADN complementario, conocido como ADNc. En esta Tesis Doctoral, la RT ha sido empleada con frecuencia para analizar e investigar los niveles de expresión de los genes presentes en las células tratadas con diferentes condiciones.

Para ello, se utilizó el kit comercial *First-Strand cDNA Synthesis* de NZYTech. Dependiendo de la concentración inicial de ARN, se añadió el volumen de muestra correspondiente a 1 µg de ARN total (entre 2 y 8 µl) a un tubo de reacción. Además, se agregaron 10 µl de una mezcla de reacción 2X (oligonucleótidos aleatorios, MgCl₂ y dNTPs), 2 µl de enzima ADNasa y, en caso necesario, se completó el volumen hasta 20 µl con agua libre de ARNasas. La mezcla se mezcló suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó a 50°C por un tiempo de 30 minutos en un termociclador *Mastercycler personal* de Eppendorf (**Figura 4.32**). Transcurrido ese tiempo, se detuvo la reacción por calor a 85°C durante 5 minutos y posteriormente, se añadió 1 µl ARNasa H y se incubó a 37°C durante 20 min para eliminar el enlace de ARN con el ADNc. Finalmente, el producto de ADNc fue almacenado a -20°C.

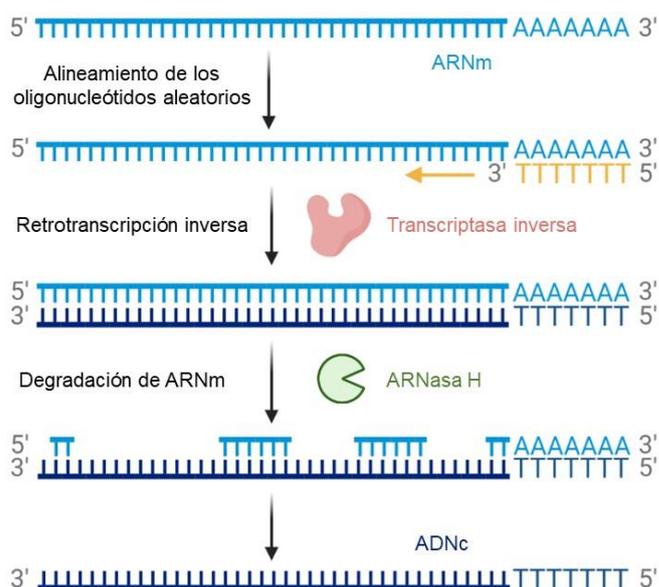


Figura 4.32. Esquema del proceso de retrotranscripción (izquierda) y termociclador *Mastercycler personal* de Eppendorf (derecha). La imagen del esquema (izquierda) ha sido elaborada a partir del protocolo, mientras que la imagen del termociclador ha sido tomada en nuestro laboratorio.

4.4.3. ANÁLISIS DE CANTIDAD Y CALIDAD DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Una de las ventajas de los ácidos nucleicos es la capacidad de absorber luz UV debido a las bases nitrogenadas aromáticas presentes en su estructura. Normalmente, se considera que la máxima absorción de una molécula de ácido nucleico ocurre a una longitud de onda de 260 nm, y esta medida nos permite determinar su concentración. Para evaluar la concentración y pureza del ARN en las muestras de ARN total purificado y del ADN en las muestras de ADN genómico purificado y de ADNc, se utilizó la técnica de espectrofotometría mediante el aparato *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific (**Figura 4.33**).



Figura 4.33. Dispositivo *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific). Imagen tomada en nuestro laboratorio.

Para determinar la concentración y pureza de los ácidos nucleicos presentes en las muestras, se colocó 1 μ l de muestra sobre el pedestal del aparato y se bajó el brazo superior. En el programa del dispositivo se seleccionó el tipo de material de trabajo, ya sea ADN de cadena sencilla, ADN de cadena doble o ARN. El programa proporcionó los siguientes resultados: la absorbancia a 260 nm (A_{260}), la relación A_{260}/A_{280} , la relación A_{260}/A_{230} , y la concentración de ARN o ADN correspondiente al valor de A_{260} . Estos parámetros nos permitieron evaluar la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos en las muestras.

Una muestra se considera que tiene una buena pureza cuando la relación A_{260}/A_{280} está en el rango de 1.8 a 2. Un valor inferior a este rango indica la presencia de proteínas en la muestra. Por otro lado, la relación A_{260}/A_{230} debe estar entre 1.8 y 2.2. Si el valor es menor, indica la presencia de contaminantes que absorben cerca de 230 nm, como fenoles, guanidina y otros compuestos procedentes de los procesos de extracción y purificación.

4.4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR (*polymerase chain reaction*) permite amplificar un fragmento específico de ADN, ya sea de cadena sencilla o doble, generando millones de copias del mismo. Estas copias amplificadas pueden ser utilizadas en una amplia variedad de aplicaciones como secuenciación, mutagénesis y alelotipado.

La amplificación de un fragmento de ADN mediante PCR requiere la presencia de cuatro componentes clave. En primer lugar, se necesitan cebadores específicos diseñados para el fragmento de ADN que se desea amplificar. Además, se requiere una enzima ADN polimerasa capaz de funcionar a altas temperaturas. Asimismo, se utiliza una mezcla que contiene los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), que son los precursores moleculares utilizados en la síntesis de ADN. Por último, se utiliza el termociclador, un equipo programable que permite controlar y repetir ciclos de temperatura necesarios para la amplificación del ADN.

Los cebadores, también conocidos como *primers*, son secuencias cortas de ADN de cadena sencilla que tienen una longitud de 18-24 pares de bases. Estos cebadores están diseñados de manera que su secuencia sea complementaria a los extremos del fragmento de ADN que se desea amplificar. Al unirse a su secuencia complementaria, los cebadores proporcionan extremos 3' libres, donde la enzima ADN polimerasa puede agregar nuevos dNTPs de forma complementaria a la hebra que se está amplificando. El cebador que se une al extremo 5' del fragmento de ADN se conoce como cebador sentido o *forward*, mientras que el que se une al extremo 3' se conoce como cebador antisentido o *reverse*.

Las enzimas ADN polimerasas utilizadas en las reacciones de PCR son enzimas termoestables, por lo que son capaces de funcionar a altas temperaturas sin desnaturalizarse. En esta Tesis Doctoral, se utilizó la Taq polimerasa, obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*. Para el funcionamiento de este tipo de enzimas se requiere un tampón que contenga iones Mg^{2+} y un pH adecuado.

La PCR consiste en la repetición de ciclos de temperatura para llevar a cabo procesos breves de síntesis de ADN mediante la acción de la enzima ADN polimerasa. Cada ciclo consta de tres etapas: desnaturalización, alineamiento y elongación (**Figura 4.34**). Durante la etapa de desnaturalización, las dos hebras del ADN se separan debido a una alta temperatura, generalmente alrededor de 94°C. En la fase de alineamiento o hibridación, la temperatura disminuye hasta alcanzar un nivel lo suficientemente bajo

para permitir que los cebadores se unan específicamente a sus secuencias diana, pero lo suficientemente alta como para evitar su unión a cualquier otra secuencia no específica. Esta temperatura varía entre 35-60°C y depende de la longitud y contenido de pares GC de los cebadores utilizados. Por último, en la fase de elongación o polimerización, la polimerasa sintetiza nuevas hebras de ADN complementarias al molde, utilizando los cebadores como punto de partida desde el extremo 3'. La temperatura de esta fase depende de la temperatura óptima de funcionamiento de la polimerasa utilizada. En este caso, la Taq polimerasa tiene una temperatura óptima alrededor de 72°C. Este ciclo de tres etapas se repite unas 20-35 veces con el fin de obtener una gran cantidad de copias de una región específica de interés del ADN. Para realizar este proceso, se utiliza el termociclador, ya que permite programar el tiempo y la temperatura necesarios para cada uno de los ciclos requeridos.

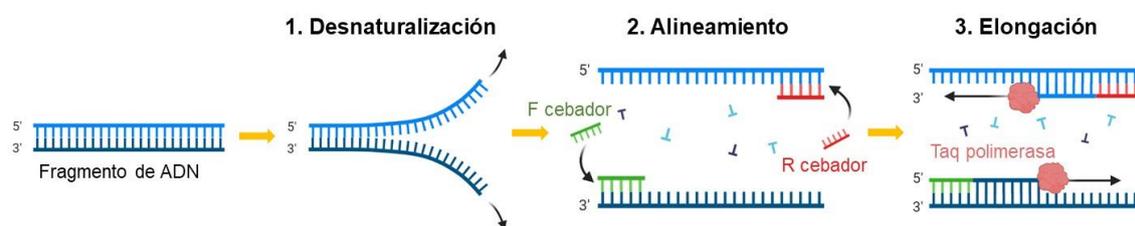


Figura 4.34. Diagrama de las etapas secuenciales durante el proceso de PCR. F cebador: cebador sentido. R cebador: cebador antisentido. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

4.4.4.1. PCR convencional

En esta Tesis Doctoral, se utilizó la técnica de PCR convencional para amplificar los fragmentos de ADN que son objetivo de los ARN guía (ARNg) en los sistemas CRISPR/Cas9 utilizados. Estos fragmentos amplificados fueron posteriormente secuenciados mediante la técnica de Sanger con el fin de confirmar la presencia de una mutación de pérdida de función después de aplicar la técnica de CRISPR/Cas9.

Para realizar la amplificación del ADN diana, se añadió un volumen equivalente a 0.5-1 µg de ADN genómico previamente purificado a un tubo de PCR, y se ajustó a 8 µl con agua ultrapura libre de nucleasas. Luego, se agregaron 1 µl de cebador *forward* y 1 µl de cebador *reverse* (con una concentración final de 0.2 µM para cada uno), 14 µl y 25 µl de la mezcla *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* de Life Technologies, dando lugar a un volumen final de 50 µl. La mezcla *AmpliTaq Gold 360 Master Mix* es un tampón comercial optimizado para reacciones de PCR, que incluye la Taq polimerasa, los 4 dNTPs e iones Mg²⁺. El tubo se agitó y se centrifugó unos segundos para asegurar que todo el volumen estuviera en el fondo. Se utilizó un tubo de control negativo en el que

se sustituyó el volumen de ADN por agua, para verificar que no había contaminación de ADN de otra fuente en ninguno de los reactivos. Los tubos correspondientes a las diferentes muestras se colocaron en el termociclador y se programaron unas determinadas condiciones (**Figura 4.35**). Los cebadores específicos que se utilizaron aparecen detallados en la sección de CRISPR/Cas9 de esta Tesis Doctoral (apartado 4.4.10. SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE MEDIANTE CRISPR/Cas9). Una vez que finalizado el proceso de amplificación, se cogió una pequeña alícuota de cada muestra para confirmar el tamaño correcto del amplicón mediante electroforesis en gel de agarosa. Las muestras se conservaron a -20°C .

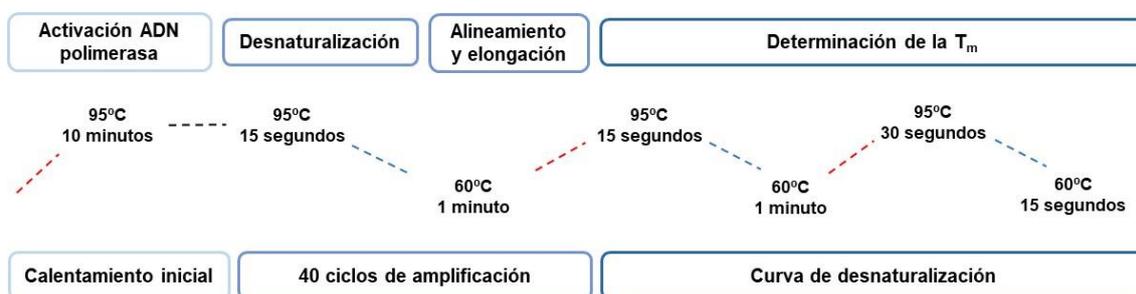


Figura 4.35. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR convencional. Imagen elaborada a partir del protocolo.

4.4.4.2. PCR cuantitativa, PCR en tiempo real o qPCR

La PCR cuantitativa, también conocida como PCR en tiempo real o qPCR (*q*: *quantitative*), es una variante de la técnica de PCR convencional que permite la detección y cuantificación del producto amplificado de PCR mediante el uso de fluoróforos cuya emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto generado. Se pueden emplear agentes intercalantes como *SYBR Green I* (**Figura 4.36**), que se une al ADN de doble cadena y aumenta considerablemente su fluorescencia (hasta mil veces), o bien sondas (oligonucleótidos) específicas marcadas con un fluoróforo, conocidas como sondas *TaqMan*. Los agentes intercalantes son económicos y fáciles de usar, pero presentan la desventaja de tener una falta de especificidad, ya que pueden unirse tanto a los productos de amplificación específicos como a los dímeros de cebadores (*primer dimers*) que pueden formarse durante la PCR. Para evitar esto, es necesario optimizar las condiciones de reacción y diseñar cuidadosamente los cebadores para evitar que se apareen entre sí.



Figura 4.36. Aumento de fluorescencia del compuesto *SYBR Green I* tras su unión al ADN de doble cadena. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizó el equipo *QuantStudio™ 5 Flex* de Applied Biosystems, disponible en la Sección de Biología Molecular de la UM (**Figura 4.37**), el cual tiene unos sensores que miden la fluorescencia después de cada ciclo de amplificación, lo que permite realizar la detección en tiempo real.

La PCR cuantitativa, en combinación con la técnica de retrotranscripción (RT), se utiliza para evaluar los niveles de expresión génica, y esta combinación de técnicas se conoce como RT-PCR. La cuantificación de la expresión génica puede ser absoluta, mediante la construcción de una curva de calibración, o relativa, comparando el nivel de expresión del gen de interés con el nivel de expresión de un gen de referencia (gen de control). Los genes de referencia comúnmente utilizados son β -actina o GAPDH, ya que su nivel de expresión se mantiene constante de manera independiente a las condiciones experimentales.

La cuantificación relativa se basa en los modelos ΔCt y $\Delta\Delta Ct$. El ciclo de PCR en el que la fluorescencia supera el umbral de detección determinado por el sensor se denomina ciclo Ct (**Figura 4.37**). El valor de Ct es menor cuanto mayor es la cantidad inicial del ADN de interés en la muestra.

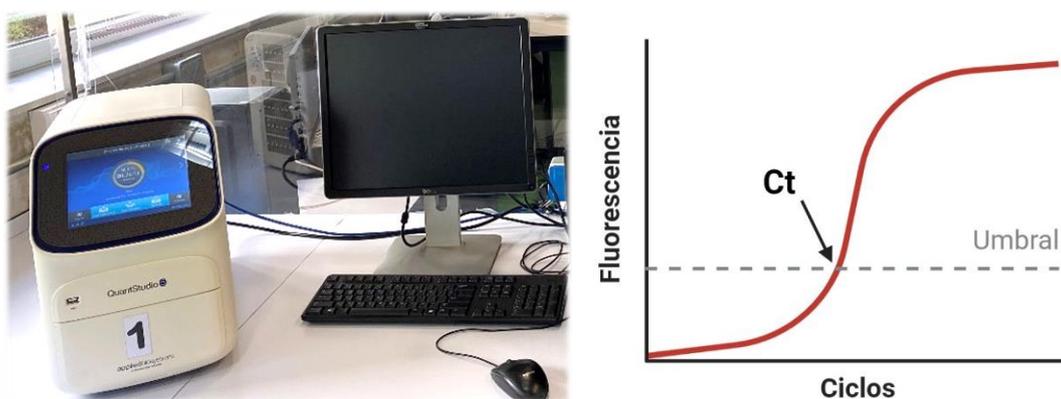


Figura 4.37. Equipo *QuantStudio™ 5 Flex* (izquierda) y representación de una curva de amplificación obtenida en una PCR en tiempo real (derecha). La imagen del dispositivo (izquierda) ha sido tomada en la Sección de Biología Molecular de la UM, mientras que la imagen de la curva de Ct ha sido elaborada a partir del fundamento de la técnica.

El modelo ΔCt compara el valor de Ct del gen de interés con el valor de Ct del gen de referencia, de la siguiente manera:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen de interés}) - Ct(\text{gen de referencia})$$

Aceptando que la eficiencia de amplificación de la PCR es del 100%, entonces:

$$2^{-\Delta Ct} = n^{\circ} \text{ de copias del gen de interés respecto a las copias del gen de referencia}$$

El ΔCt de un gen en una muestra se puede comparar con el ΔCt del mismo gen en otra muestra utilizando el modelo $\Delta\Delta Ct$. De esta manera, se obtiene que:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{condición control}) - \Delta Ct(\text{tratamiento})$$

siendo $2^{-\Delta\Delta Ct} = n^{\circ} \text{ de veces que varía la expresión de un gen en respuesta}$

a un tratamiento respecto al control no tratado

El valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ será positivo si el tratamiento induce un aumento de la expresión del gen de interés y negativo si provoca su disminución.

En definitiva, para cada muestra, se normaliza el valor de Ct del gen de interés utilizando el modelo ΔCt . Después de normalizar la expresión en cada muestra, se comparan las muestras utilizando el modelo $\Delta\Delta Ct$.

Para llevar a cabo estos experimentos, se utilizaron placas de 96 pocillos, donde cada muestra, definida por un ADN específico y una pareja de cebadores para la amplificación de un gen particular, se procesa por triplicado utilizando 3 pocillos que contienen las mismas cantidades de ADN, cebadores y reactivos. En cada pocillo de la placa se añadieron 2 μl de la mezcla de cebadores (*forward* y *reverse*), 8 μl de dilución de ADN y 10 μl de *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems). Esta última mezcla, suministrada por la Sección de Biología Molecular de la UM, es un kit comercial que contiene los reactivos necesarios para la amplificación, incluyendo la enzima ADN polimerasa *AmpliTaq Gold*, los 4 tipos de dNTPs, el fluorocromo *SYBR Green I* y el fluoróforo ROX, utilizado como referencia pasiva. Para evitar la evaporación de las muestras durante el proceso, la placa se selló con una película adhesiva. Posteriormente, se realizó una centrifugación durante 1 minuto a 1500 rpm para asegurar que todo el volumen se concentrara en el fondo de cada pocillo. Cabe destacar que las diluciones de ADN y cebadores se preparan siempre en agua ultrapura, estéril y libre de nucleasas. Los tubos utilizados también son estériles y libres de nucleasas.

Los cebadores se prepararon a una concentración de 10 μM en agua. Para cada reacción de qPCR (pocillo), se necesitó 1 μl de cebador *forward* y 1 μl de cebador *reverse*. Atendiendo al número de reacciones, se preparó en un tubo el mismo volumen de ambos cebadores para que posteriormente solo fuera necesario pipetear 2 μl de esta mezcla en cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Los cebadores utilizados en esta Tesis Doctoral fueron diseñados con el programa *Primer3web version 4.1.0* y fueron sintetizados por Life Technologies/Thermo Scientific.

Las muestras de ADN se diluyeron en agua en una proporción que varía entre 1:10 y 1:100, siendo la dilución 1:25 la más utilizada. Se requieren 8 μl de una dilución de ADN para cada reacción de qPCR (pocillo), por lo que el volumen necesario se preparó de acuerdo con el número de reacciones que se realizaron en cada caso. El ADN puede derivarse de una retrotranscripción (ADNc) o ser ADN purificado de una reacción de ChIP.

Una vez sellada y centrifugada, la placa se introdujo en el equipo de medida y se diseñó el programa de amplificación, que consistió en tres etapas (**Figura 4.38**).

Primera etapa (calentamiento inicial): Se configuró un calentamiento inicial de 10 minutos a 95°C para la activación de la enzima ADN polimerasa, *AmpliTaQ Gold*. Esta enzima es de tipo *hot start*, lo que significa que requiere un calentamiento a alta temperatura para que pueda activarse. De esta forma, se minimiza el riesgo de amplificaciones inespecíficas durante la reacción.

Segunda etapa (ciclos de alineamiento y extensión): Una vez activada la enzima, se establecieron 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos seguidos de 60°C durante 1 minuto. Durante esta etapa, se produjo el alineamiento de los cebadores con los fragmentos de ADN y la extensión de los mismos.

Tercera etapa (curva de desnaturalización): Por último, se llevaron a cabo cuatro pasos de calentamiento secuenciales. Estos consistieron en calentar a 95°C durante 15 segundos, luego a 60°C durante 1 minuto, seguido por 95°C durante 30 segundos y finalmente 60°C durante 15 segundos. Esta etapa tiene como objetivo obtener la curva de desnaturalización del producto de amplificación y determinar su temperatura de fusión o T_m (*melting temperature*). La curva de desnaturalización se obtiene al representar gráficamente la intensidad de fluorescencia en función de la temperatura. A medida que aumenta la temperatura, las hebras de ADN se desnaturalizan y la emisión de fluorescencia del *SYBR Green I* disminuye. La temperatura a la cual el 50% de la molécula de ADN está desnaturalizada se denomina T_m . Cada producto de amplificación tiene una curva de desnaturalización y una T_m característica que depende de su longitud

y composición de bases. Por tanto, realizar esta etapa permite verificar, en general, la especificidad de la amplificación.

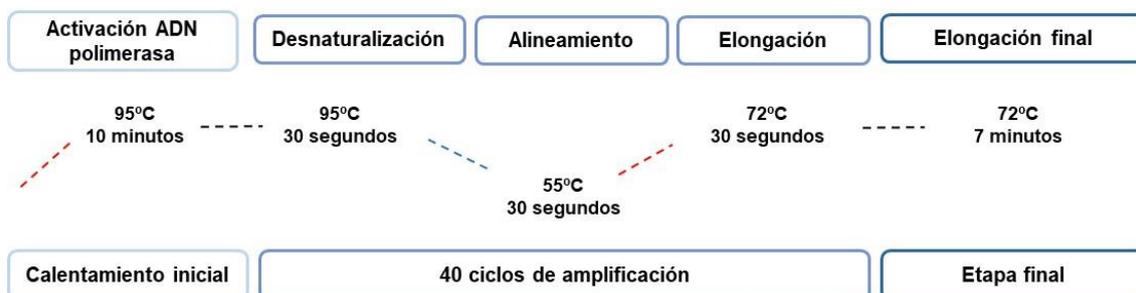


Figura 4.38. Esquema de las condiciones empleadas para los experimentos de PCR en tiempo real. Imagen elaborada a partir del protocolo.

Al finalizar el programa, se verificó que las curvas de desnaturalización se ajustaran a las expectativas previas y se procedió al análisis del nivel de expresión de cada producto de amplificación utilizando los modelos ΔCt y $\Delta\Delta Ct$. Mediante estos modelos, se compararon los valores de Ct obtenidos para cada gen de interés, permitiendo evaluar las diferencias en la expresión génica entre las muestras con los diferentes tratamientos. Se utilizó el programa *QuantStudio_Design_And_Analysis*.

4.4.5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica ampliamente utilizada para el análisis y la caracterización de moléculas de ácidos nucleicos por su sencillez y eficacia. Esta técnica presenta múltiples aplicaciones, como la detección de los productos de una reacción de PCR o la evaluación de la fragmentación de la cromatina.

Preparación del gel y el tampón

Se preparó una solución de tampón TAE (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.5) en una cantidad de 800 ml con agua destilada. Paralelamente, se pesaron entre 2-3 g de agarosa en un matraz, dependiendo del porcentaje que queramos usar para separar lo mejor posible nuestros fragmentos de ADN, y se disolvieron en 100 ml de tampón TAE mediante calor con un microondas. Después, se enfrió el matraz rápidamente hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 50°C. A continuación, se añadieron 5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) al matraz y se homogeneizó la mezcla. El contenido del matraz se vertió en un molde para gel de agarosa, colocando el peine en la zona del cátodo, y se dejó polimerizar unos 20 minutos, evitando la formación de burbujas. Una vez que el gel estuvo polimerizado, se retiró el peine y se introdujo el gel en la cubeta, vertiendo el resto de tampón TAE en la misma (700 ml).

Preparación de las muestras

Se tomaron 15-20 μl de la muestra de ADN y se mezclaron con 3 μl de un tampón de carga que contenía sacarosa al 40% (p/v), Orange G al 0.25% (p/v), EDTA a 10 mM y SDS a 100 mM. La sacarosa se utilizó para aumentar la densidad de la muestra y facilitar su carga en el pocillo, mientras que el colorante Orange G se empleó para visualizar el progreso de la electroforesis.

Para los marcadores de tamaño, se utilizó el *Step ladder 50 bp* de Sigma. Se tomó una alícuota de 5 μl de los marcadores y se mezcló con 1 μl del tampón de carga. Estos marcadores consisten en 17 fragmentos de ADN de extremos romos, con tamaños que varían desde 50 hasta 3000 pares de bases.

Desarrollo de la electroforesis

Se colocaron tanto los marcadores como las muestras en los pocillos correspondientes. A continuación, se cubrió la cubeta y se conectaron los electrodos a la fuente de corriente. Se estableció un voltaje constante de 120 voltios y se dejó que la electroforesis se desarrollara durante 50-60 minutos.

Visualización y cuantificación

Las bandas de ADN fueron visualizadas utilizando *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* de BioRad, el mismo dispositivo de análisis de imagen que utilizábamos para visualizar las bandas de proteínas en el Western blot. En este caso, el equipo fue configurado para detectar la señal del bromuro de etidio.

4.4.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP)

La técnica de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, *chromatin immunoprecipitation*) se utiliza para determinar la interacción de una proteína específica con una región particular del genoma. Esta técnica es especialmente útil para estudiar la unión de proteínas al ADN, como histonas, factores de transcripción y proteínas de remodelado de la cromatina. En este sentido, mediante la ChIP, es posible identificar las regiones del genoma con las que estas proteínas interactúan.

Durante el desarrollo de esta técnica se distinguen varias etapas (**Figura 4.39**). En primer lugar, se utiliza formaldehído para fijar las uniones entre el ADN y sus proteínas asociadas. A continuación, la cromatina fijada se fragmenta mediante sonicación. Los fragmentos resultantes se incuban con un anticuerpo primario específico para la proteína de interés con el fin de obtener aquellos fragmentos que contienen tanto la proteína de interés como el ADN asociado a ella. Posteriormente, se rompen las

interacciones entre las proteínas y el ADN, y se purifican los fragmentos de ADN. Estos fragmentos pueden amplificarse mediante técnicas como PCR o qPCR, utilizando cebadores específicos, así como someterse a secuenciación. Cuando se realiza la secuenciación masiva de todos los fragmentos de ADN obtenidos mediante la técnica ChIP, se denomina ChIP-seq (*ChIP sequencing*).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se llevaron a cabo experimentos de ChIP en diferentes células de melanoma con el objetivo de investigar la posible unión del factor de transcripción MITF a la región promotora de ADAM10.

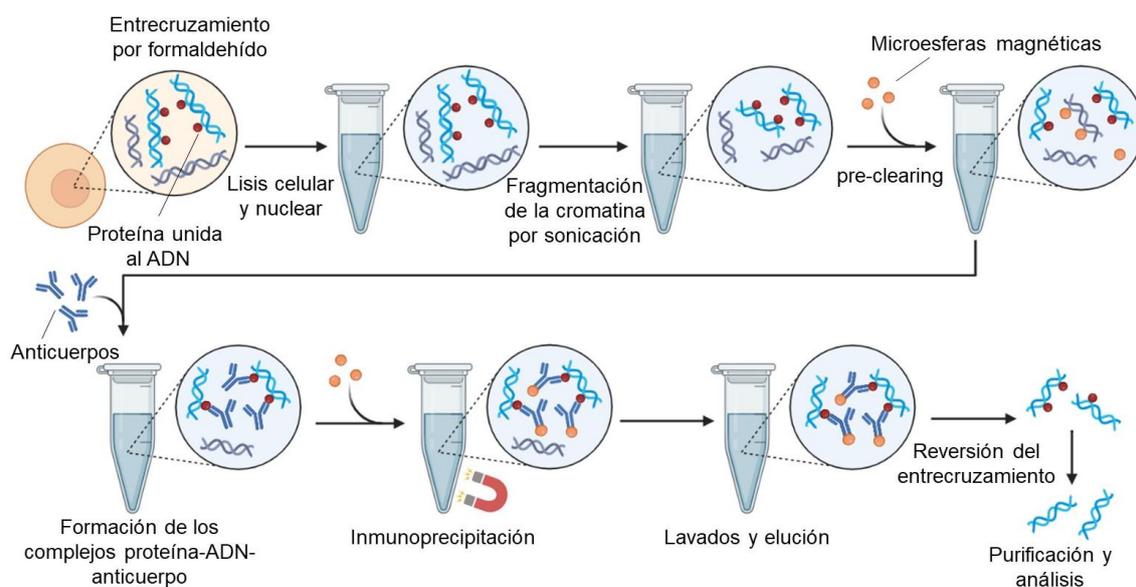


Figura 4.39. Diagrama de las principales etapas de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Imagen elaborada a partir del protocolo.

Entrecruzamiento ADN-proteínas y lisis de los núcleos

Para realizar los ensayos de ChIP se utilizaron suspensiones celulares con un recuento de más de cinco millones de células. Las células se cultivaron hasta una confluencia del 80% en frascos de 150 cm², con una capacidad máxima aproximada de 10 millones de células.

En el día del ensayo, se agregaron 2 ml de formaldehído al 4% a los frascos que contenían 18 ml de medio de cultivo, lo que resultó en una concentración final de formaldehído del 0.4%. Estos frascos se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos para permitir la formación de entrecruzamientos entre las proteínas y el ADN. Una de las grandes ventajas de la molécula de formaldehído es que su tamaño permite la formación de entrecruzamientos solo entre moléculas que están aproximadamente a una distancia de 2 Å (Hoffman et al., 2015).

Después de la incubación con formaldehído, se agregaron 2 ml de una disolución de glicina 2 M, y los frascos se incubaron durante otros 10 minutos a temperatura ambiente. La glicina tiene la función de actuar como un neutralizador y permitir la inactivación del exceso de formaldehído que pueda quedar sin reaccionar. A continuación, los frascos se colocaron sobre hielo y se eliminó el medio de cultivo junto con el formaldehído y la glicina. Las células se lavaron con 10 ml de PBS frío y se despegaron con un raspador o *scraper*. Cada suspensión celular se transfirió a un tubo y se centrifugó a $1500 \times g$ durante 5 minutos a 4°C . El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 1% SDS), complementado con 1x del cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasa (Thermo Scientific), y se incubó en hielo durante 15 minutos, agitando con un vórtex cada 5 minutos.

Fragmentación de la cromatina

Transcurrido ese tiempo, las muestras fueron sometidas a 3 ciclos de sonicación de 15 segundos cada uno, con un intervalo de descanso de 30 segundos entre cada ciclo. Se utilizó el sonicador *Ultrasonic Homogenizer 4710 Series* de Cole-Parmer a una velocidad de 4 para generar un tamaño promedio de 200 a 500 pares de bases. Seguidamente, las muestras se centrifugaron a $10000 \times g$ durante 10 minutos a 4°C , con el fin de eliminar los residuos celulares. Del sobrenadante resultante se tomó una alícuota de 50 μl para revertir el entrecruzamiento (véase más adelante), confirmar que la sonicación en las condiciones empleadas producía una fragmentación de aproximadamente 300 pares de bases mediante electroforesis en gel de agarosa y cuantificar la concentración de cromatina en el *NanoDrop 2000* de Thermo Scientific. Esta alícuota se guardaría a -80°C , ya que se utilizaría más adelante como nuestro *input*, fracción de la muestra que contiene todos los fragmentos de ADN obtenidos tras la sonicación.

Inmunoprecipitación de los complejos proteína-ADN

Una vez cuantificadas las muestras, se cogieron los volúmenes correspondientes a 70 μg de cromatina, se diluyeron 9 veces en el tampón de dilución (16.7 mM Tris-HCl [pH 8.0], 167 mM NaCl, 1.2 mM EDTA [pH 8.0], 0.01% SDS, 1.1% Triton-X100) y se realizó una etapa de lavado o *pre-clearing* para eliminar todo aquello que se unía inespecíficamente a las microesferas magnéticas. Al igual que para la inmunoprecipitación de proteínas, se usaron 50 μl de la suspensión de microesferas magnéticas recubiertas con proteína G de Merck Millipore (*PureProteome Protein G Magnetic Beads*), previamente lavadas con PBS-T dos veces durante 5 minutos cada lavado. Esta etapa de *pre-clearing* se llevó a cabo durante 2 horas a 4°C en la rueda

giratoria. Luego, se tomó el sobrenadante con ayuda de una gradilla magnética y se dividió en dos partes para incubar con 5 µg del anticuerpo correspondiente durante toda la noche a 4°C en rotación giratoria. En este caso, se utilizaron un anticuerpo específico anti-MITF [MAB3747, Merck Millipore] y un anticuerpo anti-IgG de ratón [06-371, Merck Millipore] como nuestro control negativo.

Al día siguiente, las muestras se incubaron con 50 µl de la suspensión de microesferas magnéticas recubiertas con proteína G previamente lavadas durante 2 horas a 4°C en la rueda giratoria. Transcurrido este tiempo, se recuperaron los complejos proteína-ADN unidos a las microesferas magnéticas con ayuda de la gradilla magnética y se realizaron dos lavados durante 10 minutos a 4°C en rotación con los siguientes tampones (en orden): tampón de baja concentración en sales (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8.0], 0.1% SDS, 1% Triton-X100), tampón de alta concentración en sales (20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 500 mM NaCl, 2 mM EDTA [pH 8.0], 0.1% SDS, 1% Triton-X100), tampón de cloruro de litio (0.25 M LiCl, 10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0], 1% NP-40, 1% desoxicolato sódico), y tampón Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Elución de los complejos proteína-ADN y reversión de los entrecruzamientos

Después de completar el último lavado, se disociaron los complejos proteína-ADN de las microesferas magnéticas añadiendo a cada tubo 250 µl de un tampón de elución (100 mM NaHCO₃, 1% SDS) recién preparado durante 15 minutos en agitación rotatoria y a temperatura ambiente. Se recogió el sobrenadante con ayuda de la gradilla magnética y se repitió el proceso de elución para obtener un volumen final de 500 µl. Los entrecruzamientos se revertieron tras incubar con NaCl 0.3 M y 10 µg de ARNasa A durante toda la noche a 65°C, seguida de la adición de Tris-HCl 4 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0) y 20 µg de Proteinasa K durante 1 hora a 42°C. Esto permitió la disociación de los anticuerpos y la proteína de interés con el ADN asociado, así como la ruptura de los enlaces entre la proteína de interés y el ADN unido a ella.

Purificación del ADN

Los fragmentos de ADN fueron extraídos y purificados siguiendo los pasos descritos anteriormente en el apartado 4.4.1.1. Extracción y purificación de ADN genómico de esta Tesis Doctoral. Se empleó el kit comercial *Tissue gDNA Isolation* de NZYTech a partir de la adición del etanol 100%. Se obtuvo un volumen final de 50 µl para cada muestra.

Análisis de los fragmentos de ADN purificado mediante qPCR

Se utilizó la técnica de qPCR para analizar los fragmentos de ADN purificado. Se realizaron varias diluciones de las muestras y se analizaron por triplicado. Se emplearon dos pares de cebadores diseñados para amplificar la secuencia específica de cada uno de los promotores en los que se deseaba estudiar su ocupación por la proteína inmunoprecipitada, el factor de transcripción MITF. En este caso, diseñamos un par de cebadores que se unían a la región promotora del gen *ADAM10* y un par de cebadores que hibridaban con una región alejada del promotor del gen *SILV*, donde se sabe que no se une MITF, lo que nos permitió utilizarlo como control negativo de nuestra muestra inmunoprecipitada. El gen *SILV* codifica para la proteína premelanosoma (PMEL).

Así pues, se analizaron la expresión de estos dos genes (*ADAM10* y *SILV*) en tres condiciones diferentes: En las muestras inmunoprecipitadas para el anticuerpo anti-IgG, utilizado para estudiar todo aquello que se pegaba inespecíficamente a las microesferas magnéticas; en las muestras inmunoprecipitadas para nuestra proteína de interés (MITF); y en las alícuotas que tomamos antes de realizar la inmunoprecipitación, *input*. Esta última muestra se caracteriza por contener toda la cromatina fragmentada, por lo que será usada como control positivo. Para el *input* se realizaron diluciones mayores en comparación con las otras dos muestras.

Para la cuantificación relativa del número de copias de los fragmentos de ADN inmunoprecipitados junto con la proteína de interés, se utilizó el modelo ΔCt , asumiendo una eficiencia de amplificación del 100%. La normalización de los datos se realizó mediante el método denominado "señal sobre el fondo". Con este método, a los valores de Ct para los genes de interés en las muestras inmunoprecipitadas para MITF se les restaron los valores de Ct para esos genes en las muestras inmunoprecipitadas para IgG, considerados como señal de fondo. De esta manera, se calculó:

$$\Delta Ct = Ct(\text{gen de estudio en muestra inmunoprecipitada para MITF}) - Ct(\text{gen de estudio en muestra inmunoprecipitada para IgG})$$

$$2^{-\Delta Ct} = \frac{\text{copias del gen de estudio en muestra inmunoprecipitada para MITF}}{\text{copias del gen de estudio en muestra inmunoprecipitada para IgG}}$$

4.4.7. SOBREENPRESIÓN TRANSITORIA DE UN GEN

Con esta técnica se lleva a cabo la sobreexpresión de un gen específico mediante la transfección de células con un plásmido diseñado para expresar dicho gen. El término plásmido hace referencia a una molécula de ADN circular de pequeño tamaño que se encuentra presente en bacterias y otros organismos microscópicos. Los plásmidos

tienen la capacidad de replicarse de forma independiente y, normalmente, contienen un número reducido de genes que pueden ser transmitidos de una célula a otra. Estas características convierten a los plásmidos en una herramienta ampliamente utilizada en investigación, sobre todo, en técnicas de ADN recombinante.

Aunque se utilizan diferentes tipos de plásmidos de expresión, todos comparten ciertos elementos comunes (**Figura 4.40**), entre los que se incluyen:

- Origen de replicación: es una secuencia de ADN reconocida por las proteínas responsables de iniciar la replicación del ADN.
- Marcador de selección: es un gen que proporciona resistencia a un antibiótico específico o confiere un fenotipo particular a las células transfectadas. Este marcador permite la selección y discriminación de las células que han sido transfectadas con el plásmido de expresión.
- Sitio de clonación múltiple: es una región del plásmido que contiene múltiples sitios de corte específicos para diferentes enzimas de restricción. Estos sitios proporcionan una gran flexibilidad para insertar el fragmento de ADN correspondiente al gen de interés que se desea copiar.
- Promotor: es una secuencia de ADN ubicada aguas arriba del gen de interés en el plásmido. El promotor facilita la unión de la maquinaria de inicio de la transcripción, lo que es esencial para la expresión del gen.
- Otras secuencias: el plásmido puede contener secuencias adicionales, como secuencias responsables de finalizar la transcripción, secuencias para la adición de la cola de poliadenilación y secuencias que permiten la traducción del transcrito.



Figura 4.40. Elementos comunes que comparten los plásmidos de expresión. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Para lograr la sobreexpresión transitoria de MITF, se utilizó el plásmido pCMV14-3xFLAG-MITF. Las células se cultivaron en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50-70%. Luego, fueron transfectadas con el plásmido de sobreexpresión de MITF utilizando el reactivo de transfección *Fugene 6* (Promega). En cada pocillo, se mantuvo la relación 3:1 de *Fugene* (μl):ADN (μg), empleando medio de suero reducido Opti-MEM (Thermo Scientific) como medio de transfección. Primero se diluyó el volumen correspondiente de *Fugene* en Opti-MEM, se agitó suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió el volumen adecuado de ADN y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadió todo el volumen gota a gota por toda la superficie del pocillo y las células se incubaron hasta 48-72 horas antes del análisis. Se realizaron controles de transfección utilizando la versión vacía del plásmido, es decir, el mismo plásmido, pero sin el gen de interés clonado. Estos controles permitieron evaluar el efecto específico de la sobreexpresión de MITF en los experimentos.

4.4.8. TRANSFECCIÓN ESTABLE DE ADN

La generación de una línea estable de melanoma (501-mel) inducible mediante doxiciclina para MITF se realizó mediante el sistema *PiggyBac*, el cual requiere el uso de tres elementos: un plásmido con el gen para expresar la enzima transposasa y dos transposones con diferente información génica.

Un transposón es una secuencia de ADN, que puede cambiar su posición relativa dentro del genoma completo de una célula. En el sistema *PiggyBac*, la enzima transposasa utiliza un mecanismo de “cortar y pegar” para transferir rápidamente la secuencia de ADN de interés del vector transposón a una de las secuencias “TTAA” distribuidas por todo el genoma de la célula. Este mecanismo de transferencia se debe a que la transposasa reconoce las secuencias de repetición terminal invertida (ITR, *inverted terminal repeat*) específicas del transposón situadas en ambos extremos del fragmento de ADN de interés (**Figura 4.41**).

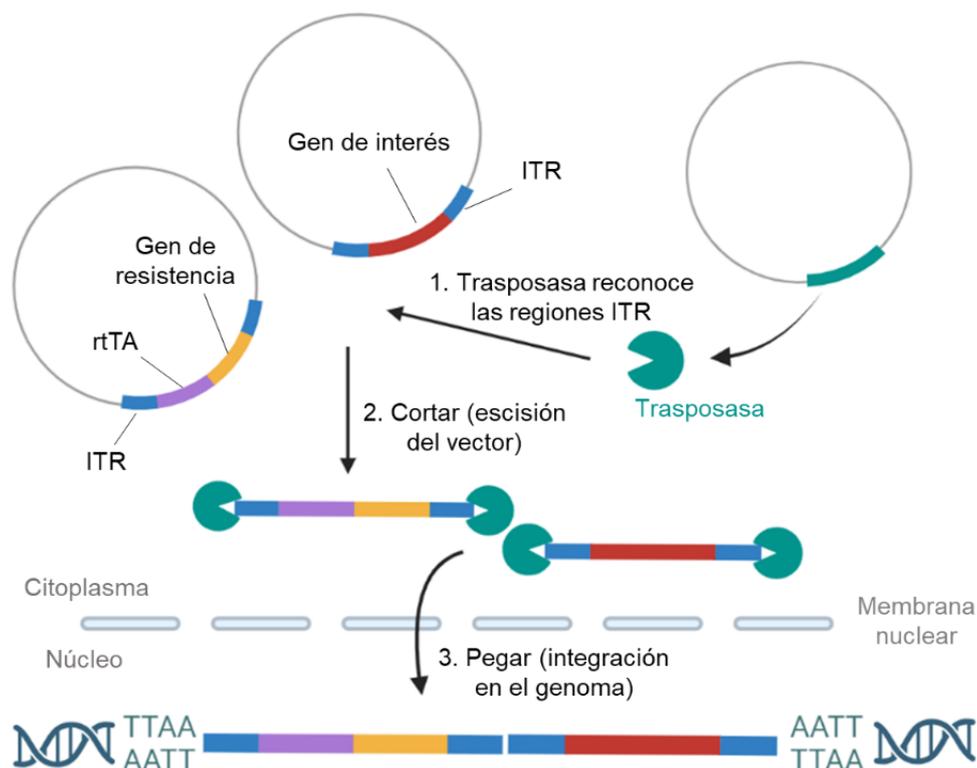


Figura 4.41. Diagrama de los principales pasos que se llevan a cabo con el sistema el sistema *PiggyBac* para integrar una o varias secuencias de ADN en el genoma de la célula. ITR: repetición terminal invertida. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Para realizar este ensayo, se utilizaron tres elementos principales: un transposón que contenía el gen de expresión de MITF (pPB-hCMV1-chA μ A-MITF), un transposón que contenía el gen de resistencia a neomicina y el gen de expresión de *rtTA* (pPB-hCMV1-*rtTA*-IRES-Neo) y un plásmido que contenía el gen para la expresión de la transposasa. La proteína *rtTA* se expresa constitutivamente bajo el fuerte promotor del citomegalovirus (CMV) y, en presencia de doxiciclina, induce la expresión de la proteína diana (MITF). Asimismo, la expresión del gen de resistencia a neomicina permite hacer una selección de aquellas células que han sido transfectadas. Las células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50-70%. Luego, fueron transfectadas mediante el reactivo *Fugene 6* (Promega). Para cada pocillo, se preparó una relación 6:2 de *Fugene* (μ l) y DNA (μ g), por lo que se utilizaron 2 μ g de los tres elementos del sistema *PiggyBac* (1.8 μ g de pPB-hCMV1-chA μ A-MITF, 0.1 μ g de pPB-hCMV1-*rtTA*-IRES-Neo y 0.1 μ g de plásmido-transposasa), 6 μ l de *Fugene* y se añadió el volumen correspondiente de Opti-MEM (Thermo Scientific) hasta conseguir un volumen final de 100 μ l. Esta mezcla se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se añadieron los 100 μ l de la mezcla de transfección gota a gota por toda la superficie del pocillo y las células se

incubaron hasta 48 horas. Se realizaron controles de transfección utilizando un vector vacío que no expresa nuestro gen de interés (MITF). Estos controles permitieron estudiar el efecto específico de la sobreexpresión de MITF en los experimentos.

Transcurridas 48 horas desde la transfección, se retiró el medio de cultivo y se comenzó la selección de aquellas células que habían sido transfectadas con el sistema *PiggyBac*. Para ello, se añadió al medio de cultivo el antibiótico geneticina (G418) de Thermo Scientific a una concentración final de 750 µg/ml. Durante 7-9 días se utilizó este medio selectivo, el cual era sustituido cada 48 horas, con el fin de eliminar aquellas células no transfectadas. A continuación, se aislaron los clones mediante las técnicas de aislamiento por dilución seriada y por dilución en placa de Petri, descritas más adelante (apartado 4.4.10. SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE MEDIANTE CRISPR/Cas9). Una vez que se expandieron varios clones, se añadieron diferentes cantidades de doxiciclina para analizar la expresión de MITF a 24, 48 y 72 horas. Finalmente, se seleccionaron aquellos clones que mostraban una expresión de MITF inducible con doxiciclina y se crecieron en frascos de cultivo para obtener una línea celular.

4.4.9. SILENCIAMIENTO GÉNICO TRANSITORIO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN

Los ARN pequeños de interferencia o siRNAs (*small interfering RNAs*) son moléculas de ARN pequeñas que se utilizan para anular transitoriamente la expresión de genes endógenos. Estos siRNAs consisten en oligonucleótidos de ARN que se emparejan con el ARN mensajero de un gen específico de interés, lo que impide su traducción. Para introducir estos siRNAs en las células, se emplea la Lipofectamina 2000 (Invitrogen), un agente de transfección que tiene la capacidad de formar liposomas catiónicos en disolución, los cuales pueden atrapar ácidos nucleicos en su interior. La membrana de estos liposomas se fusiona con la membrana plasmática de las células diana, liberando así su contenido en el interior celular. En esta Tesis Doctoral, se emplearon pequeños ARNs de interferencia específicos contra diferentes genes de interés, utilizando mayoritariamente los de tipo *Stealth siRNAs* de Life Technologies.

Para realizar los ensayos de silenciamiento, las células se cultivaron en medio sin antibióticos hasta una confluencia del 50-70%. Es importante asegurarse de que las células estén en un medio libre de antibióticos, ya que estos pueden incorporarse a los liposomas e interferir en la transfección. Estos experimentos de silenciamiento transitorio se realizaron en placas de 6 pocillos.

En primer lugar, la Lipofectamina 2000 se diluyó 20 veces en medio Opti-MEM, con bajo contenido de suero (Gibco). Para ello, se cogieron 10 μ l de Lipofectamina 2000 y se diluyeron en 190 μ l de Opti-MEM, para cada pocillo. La suspensión se agitó suavemente y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Mientras tanto, el siRNA se diluyó hasta una concentración de 83 nM en 200 μ l de Opti-MEM en un tubo separado. Transcurridos los 5 minutos, se vertió la dilución de Lipofectamina sobre la dilución de siRNA, se agitó suavemente y la mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. El medio de cultivo se sustituyó por medio fresco libre de antibióticos y suplementado con un 10% de FBS, antes de añadir la mezcla de siRNA-Lipofectamina gota a gota. Para los pocillos de control negativo del silenciamiento, se utilizaron los oligonucleótidos *RNAi Negative Control Duplex* de Life Technologies. Después de 24 horas, se sustituyó el medio de todos los pocillos por medio fresco completo.

La efectividad del silenciamiento génico se confirmó mediante Western blot y qPCR después de 24-72 horas de la transfección. En aquellos ensayos en los que se llevó a cabo un tratamiento adicional posterior al silenciamiento, dicho tratamiento se realizó siempre dentro del intervalo temporal en el que se había confirmado previamente el silenciamiento. Esto garantizó que el tratamiento adicional se aplicara cuando el silenciamiento ya había sido establecido.

4.4.10. SILENCIAMIENTO GÉNICO ESTABLE MEDIANTE CRISPR/Cas9

El sistema CRISPR/Cas9 es una poderosa herramienta de edición génica que consiste en la capacidad de la endonucleasa Cas9 (*CRISPR-associated protein 9*) para cortar de manera precisa una secuencia específica de ADN, utilizando una molécula de ARN denominada ARN guía (**Figura 4.42**). Este sistema deriva de un mecanismo de defensa presente en algunas bacterias y arqueas, que les permite proteger su genoma de la invasión de ADN exógeno, como fagos u otros elementos genéticos móviles. Estos microorganismos contienen en su genoma unas “repeticiones cortas, palindrómicas, agrupadas y regularmente interespaciadas”, conocidas como CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*). Durante una infección inicial, los fragmentos de ADN viral se integran entre las secuencias CRISPR y posteriormente, todo el conjunto se transcribe en ARN (CRISPR ARN). En infecciones posteriores, el complejo CRISPR ARN-Cas9 reconoce la secuencia complementaria del ADN viral y realiza un corte preciso en el mismo.

Después de este descubrimiento se diseñó un sistema CRISPR/Cas9 comercial basado en plásmidos para el silenciamiento permanente de un gen, que está compuesto por varios elementos:

1. Plásmido knockout: Cas9 y ARN guía

Los plásmidos *knockout* o plásmidos "KO" son plásmidos que contienen la información genética necesaria para lograr la inactivación específica de un gen de interés. Estos plásmidos expresan tanto la endonucleasa Cas9 como el ARN guía correspondiente al gen de estudio.

Por un lado, la endonucleasa Cas9 de *Streptococcus pyogenes* es una de las enzimas más ampliamente utilizadas en los sistemas CRISPR comerciales. Cas9 tiene dos dominios con actividad nucleasa (RuvC y HNH) que se unen al ADN y producen una rotura de doble hebra (DSB, *double strand break*). Actualmente, existen variantes recombinantes de Cas9 en las que uno de los dominios con actividad nucleasa ha sido mutado, de manera que se generan roturas de hebra sencilla (SSB, *single strand break*), lo que permite un mayor nivel de precisión en la técnica.

Por otro lado, los ARNs guía constan de una secuencia "andamio" y una secuencia "espaciadora". La secuencia andamio es responsable de la unión con la endonucleasa Cas9, mientras que la secuencia espaciadora consiste en una secuencia de 20 nucleótidos que es complementaria a una región específica de ADN diana dentro del gen que se desea silenciar. Los últimos 8-10 nucleótidos en el extremo 3' de la secuencia espaciadora se conocen como "secuencia semilla". Estos nucleótidos juegan un papel crucial en la especificidad de reconocimiento del ARN guía y determinan la complementariedad con el ADN diana.

2. Fragmento de ADN diana en el gen que se desea silenciar

Los complejos Cas9-ARNg hibridan con el ADN diana con ayuda del reconocimiento de una secuencia conocida como PAM (*protospacer adjacent motif*). El ADN diana debe ser una secuencia única, es decir, no debe repetirse en ninguna otra parte del genoma. Esto es fundamental para garantizar que el complejo Cas9-ARNg corte específicamente en la región de interés y no en otras partes del genoma con secuencias similares. Además, el ADN diana debe estar ubicado aguas arriba de una secuencia PAM determinada. La secuencia PAM consta de tres nucleótidos y es diferente para cada tipo de endonucleasa. Para la Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, la secuencia PAM más comúnmente utilizada es 3'-NGG, donde "N" puede representar cualquier nucleótido.

3. Plásmido HDR: reparación y selección

Las roturas de doble hebra (DSBs) en el ADN producidas por el complejo Cas9-ARNg pueden ser reparadas por dos sistemas celulares diferentes: el sistema de unión de extremos no homólogos (NHEJ, *non-homologous end-joining*) y el sistema de recombinación homóloga (HR, *homologous recombination*).

El sistema NHEJ es el mecanismo de reparación de ADN más activo y eficiente para las DSBs generadas por el complejo Cas9-ARNg, aunque es más propenso a cometer errores. A menudo, el NHEJ provoca pequeñas inserciones o deleciones en el sitio de la DSB pudiendo ocasionar cambios en la lectura del código genético durante la traducción, como la inserción o deleción de aminoácidos o la aparición prematura de un codón de parada. Idealmente, cualquiera de estos procesos resultaría en una pérdida de función de la proteína codificada, logrando así el silenciamiento efectivo del gen. La reparación de la DSB se llevará a cabo de manera diferente en cada célula, por lo que se obtiene una población transfectada policlonal en la cual el silenciamiento se debe a una mutación distinta. No obstante, el aislamiento de clones permitirá obtener una población homogénea en la cual el silenciamiento es consecuencia de una mutación específica.

Normalmente, los sistemas CRISPR comerciales ofrecen la opción de realizar la reparación de las DSBs de manera predeterminada mediante un segundo plásmido que contiene una secuencia molde para la reparación dirigida por homología (HDR, *homology directed repair*). Los “plásmidos HDR” presentan una secuencia que hibrida tanto aguas arriba como aguas abajo de la DSB generada por la enzima Cas9 y ARNg. Cuando se utiliza este sistema CRISPR, el marcador de selección se incorpora en el “plásmido HDR” en lugar de estar presente en el plásmido *knockout*. Es importante tener en cuenta que la eficiencia de la reparación mediante HDR es baja, generalmente inferior al 10%. Por lo tanto, si se desea obtener un clon en el que la reparación se haya realizado de acuerdo con algún molde concreto, se requiere de confirmación por secuenciación. Para nuestros diseños experimentales, no fue necesario obtener un clon con una secuencia de reparación específica, sino que simplemente con la selección de un clon con una mutación que causaba pérdida de función fue suficiente.

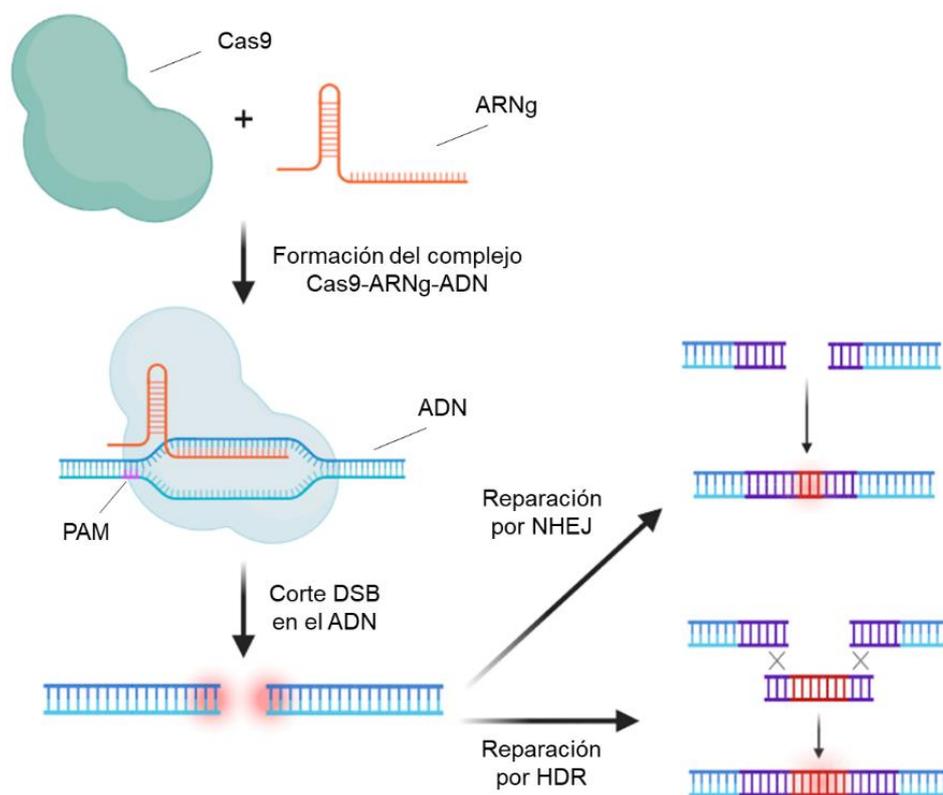


Figura 4.42. Diagrama simplificado del mecanismo de acción del sistema CRISPR/Cas9. HDR: reparación dirigida por homología, NHEJ: sistema de unión de extremos no homólogos. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Para el silenciamiento estable o *knockdown* de MITF y ADAM10 en células humanas y de ratón, se utilizaron los siguientes plásmidos de Santa Cruz Biotechnology: MITFh [sc-400401], MITFm [sc-421654] y ADAM10m [sc-418981]. En cada silenciamiento se utilizó un sistema con un "plásmido *knockout*" que consiste en un conjunto de tres plásmidos, donde todos expresan la endonucleasa Cas9 y la proteína de fluorescencia verde GFP, pero cada uno de ellos contiene un ARNg distinto. Por otro lado, el "plásmido HDR" también está compuesto por una combinación de 2-3 plásmidos, los cuales confieren resistencia a la puromicina y expresan la proteína de fluorescencia roja RFP (*red fluorescence protein*), pero cada uno de ellos contiene una secuencia molde diferente diseñada para la reparación de las DSBs en la región de unión de cada uno de los tres ARNg presentes en el "plásmido *knockout*" (**Figura 4.43**).

El protocolo que se llevó a cabo para realizar este silenciamiento se puede dividir en cinco etapas: transfección, selección, aislamiento de clones, confirmación del silenciamiento y verificación de la mutación de pérdida de función.

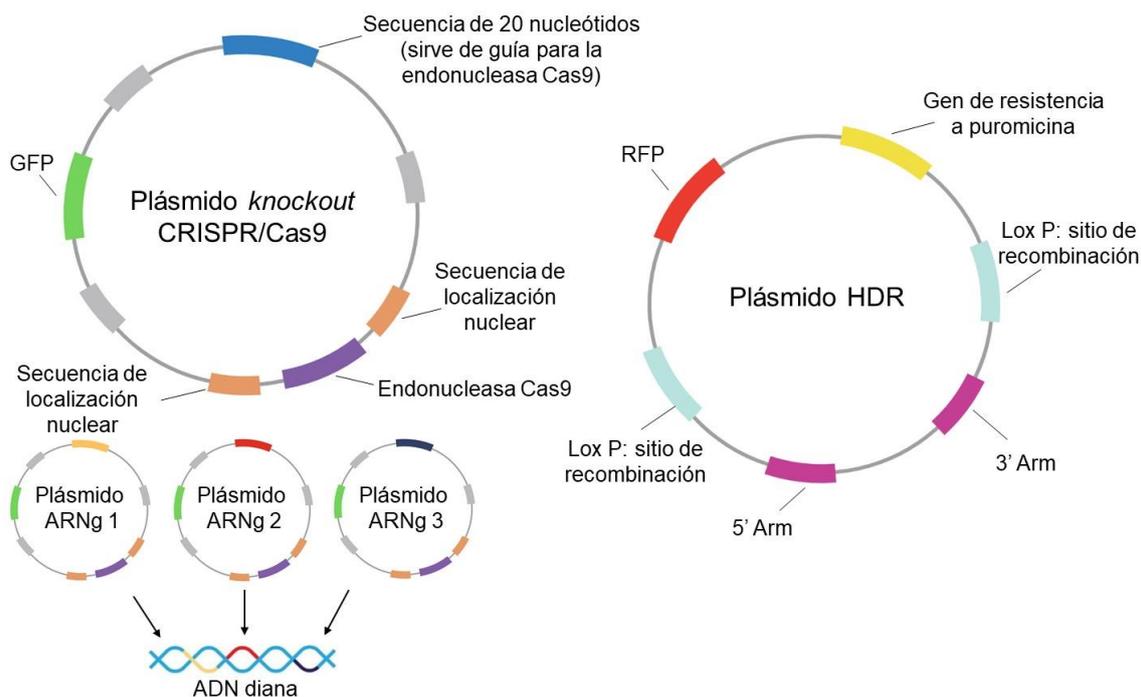


Figura 4.43. Estructura simplificada de los plásmidos utilizados para el silenciamiento estable de un gen mediante la técnica de CRISPR/Cas9. GFP: proteína verde fluorescente, HDR: reparación dirigida por homología, RFP: proteína roja fluorescente. Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

Transfección

Para comenzar, se cultivaron células en placas de 6 pocillos hasta alcanzar una confluencia del 50-70%. A continuación, se llevó a cabo la transfección utilizando los plásmidos *knockout* y HDR junto con el reactivo de transfección *Fugene 6* (Promega). Para cada pocillo, la relación utilizada entre la cantidad de ADN (μg) y el reactivo de transfección (μl) fue de 1:10. De esta forma, en un volumen final de 150 μl , se preparó la mezcla que contenía 1.5 μg de cada uno de los plásmidos *knockout* y HDR (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$), 20 μl de *Fugene* y 127 μl de medio de transfección Opti-MEM (Thermo Scientific), se agitó suavemente y se dejó incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió esta mezcla gota a gota por toda la superficie del pocillo que contenía las células de interés.

Selección

Transcurridas 48 horas de la transfección, se eliminó el medio de transfección y se sustituyó por medio de cultivo fresco que contenía el antibiótico puromicina a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para seleccionar a aquellas células que habían incorporado el plásmido de resistencia a dicho antibiótico. Previamente, pasadas 24 horas desde la transfección, se había evaluado la eficacia del proceso debido a las proteínas

fluorescente que codifican los plásmidos *knockout* y HDR del sistema CRISPR empleado. De esta forma, haciendo uso del microscopio de fluorescencia, se identificó la presencia de células que expresaban tanto GFP como RFP, lo que indicaba que habían incorporado ambos tipos de plásmido. El medio de selección se mantuvo durante 4-5 días.

Aislamiento de clones

Para el aislamiento de clones, se emplearon dos estrategias simultáneas: el aislamiento por dilución seriada y el aislamiento por dilución en placas de Petri.

En el aislamiento por dilución seriada, se procedió a la tripsinización del pocillo que contenía las células vivas después de la selección, obteniendo una suspensión celular. En una placa de 96 pocillos, se agregaron 200 μl de medio completo con puromicina a cada pocillo. En el pocillo A1 se añadieron 50 μl de la suspensión celular, se agitó todo el contenido con la micropipeta, y se transfirieron 50 μl de esta dilución al pocillo A2. Nuevamente, se mezcló bien el pocillo A2 y se pasaron 50 μl al pocillo A3, y así sucesivamente, realizando unas 10 diluciones seriadas. Este procedimiento se repitió en otras filas de la placa partiendo de diferentes volúmenes de la suspensión celular inicial. El objetivo de estas diluciones seriadas era aislar una única célula por pocillo, la cual posteriormente se multiplicaría dando origen a una población celular, también conocida como "clon".

En el aislamiento por dilución en placa de Petri, se cogieron 3-5 μl de la misma suspensión celular y se sembraron en una placa de Petri de 10 centímetros de diámetro. En este método, se busca una densidad celular muy baja con el fin de que las células queden separadas unas de otras durante la siembra. De esta manera, las colonias formadas posteriormente deben ser poblaciones celulares originadas a partir de una única célula. En los días siguientes, utilizando un microscopio invertido y una punta de micropipeta, se recogieron las colonias y se transfieren a una placa de 12 pocillos para que siguieran creciendo. A este proceso, se le conoce comúnmente como "picar colonias".

Las colonias aisladas mediante cualquiera de los dos métodos se cultivaron y se expandieron, utilizando placas de mayor tamaño en cada subcultivo, hasta llegar a crecer en frascos de 25 cm^2 . Este escalado en el tamaño de las placas nos permite obtener una cantidad suficiente de masa celular para confirmar el éxito del silenciamiento mediante diversas técnicas.

Confirmación del silenciamiento

La confirmación del silenciamiento se realizó mediante distintos ensayos, como qPCR, Western blot e inmunocitofluorescencia específicamente para el gen silenciado en cada caso. Por un lado, mediante qPCR podemos determinar si la expresión del gen de interés se ha reducido significativamente en comparación con el control. El Western blot nos permite analizar si la cantidad de proteína ha disminuido en las células tratadas en comparación con las no tratadas. Por último, la inmunocitofluorescencia nos ayuda a determinar si se trata de una población homogénea de células en las que el gen de interés ha sido silenciado o si hay una mezcla de células silenciadas y no silenciadas. En el último caso, sería necesario repetir el proceso de aislamiento de clones (subclonar) para obtener una población más homogénea de células silenciadas. En cualquier caso, estos ensayos nos proporcionan información crucial para confirmar el éxito del silenciamiento y validar los resultados obtenidos.

Verificación de la mutación de pérdida de función

Una vez que tenemos una población homogénea que muestra silenciamiento, es necesario confirmar que ambos alelos del gen de interés han sido modificados, lo que resulta en la introducción de un codón de parada prematuro o en la generación de una proteína no funcional. Para llevar a cabo esta confirmación, se procedió a la extracción del ADN genómico de las células y se realizó la amplificación por PCR de la región de unión de cada uno de los tres ARNg que contenía el sistema CRISPR mediante el uso de cebadores específicos (**Tabla 4.2**). El producto resultante de la PCR fue purificado utilizando el *PureLink Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* de Invitrogen. Además, se comprobó el tamaño adecuado de los fragmentos amplificados mediante la electroforesis en gel de agarosa y se secuenciaron por el método de Sanger, utilizando un solo cebador del par de cebadores utilizado en la PCR. Esta secuenciación, realizada en la Sección de Biología Molecular de la UM, permitió identificar el tipo de mutación que se había introducido en los alelos de la región estudiada en el gen de interés.

Cebadores	Secuencia
MITF - ARNg 1 Ratón FW	5' TAGCGTGAGGGTTGGAGTCT 3'
MITF - ARNg 1 Ratón RV	5' GAGCTGCGATCATTACAAAA 3'
MITF - ARNg 2 y 3 Ratón FW	5' CTCTGATGGAAGCCACGCAT 3'
MITF - ARNg 2 y 3 Ratón RV	5' TGATGGTAAGGCCTGGCGG 3'
MITF - ARNg 1 Humano FW	5' AGGAGTTGCACTAGCGGTGT 3'
MITF - ARNg 1 Humano RV	5' CACCACTCACCTGCTCTTCA 3'
MITF - ARNg 2 Humano FW	5' CTCGAAAACCCACCAAGTA 3'
MITF - ARNg 2 Humano RV	5' CTCCCGTCATGTGCTCTACA 3'
MITF - ARNg 3 Humano FW	5' TTCATCTTTTGGTCAGATTCCA 3'
MITF - ARNg 3 Humano RV	5' AATCTTGCAGCAACTTAGGG 3'
ADAM10 - ARNg 1 Ratón FW	5' AGGATTTGGATCCTTTAAATTTCTTT 3'
ADAM10 - ARNg 1 Ratón RV	5' CTTTAAATTCATCACTAAAAAGGGAAG 3'
ADAM10 - ARNg 2 y 3 Ratón FW	5' CAATGTGGATTCATTACACCAA 3'
ADAM10 - ARNg 2 y 3 Ratón RV	5' TTTACTCACCTTCCATGAGCA 3'

Tabla 4.2. Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por PCR de las regiones de unión de los ARNg y para la secuenciación de estas por el método de Sanger. ADAM10: proteína desintegrina y metaloproteasa 10, ARNg: ARN guía, MITF: factor de transcripción asociado a microftalmia.

4.4.11. GENERACIÓN DE PLÁSMIDOS MUTANTES

Se utilizó el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies) para generar un plásmido mutante empleado en los ensayos de luciferasa. Este kit emplea un sistema de mutagénesis dirigida con una eficiencia de mutación superior al 80%. La mutagénesis de sitio dirigido, conocida también como mutagénesis dirigida, es una técnica de biología molecular empleada para generar mutaciones específicas en una secuencia de ADN.

En primer lugar, se utilizó la plataforma *QuikChange Primer Design* de Agilent Technologies para diseñar los cebadores necesarios para llevar cabo la mutación de interés en la secuencia de unión a MITF (E-Box), cambiando CACGTG por CTGGTG. El plásmido del promotor de ADAM10 (RenSP, #S722690) fue empleado como molde. De esta forma, se obtuvieron los cebadores Mutante-*Forward* (5'-GCC CGC GCG TCA CCA GGT GAG GAA GGA G-3') y Mutante-*Reverse* (5'-CTC CTT CCT CAC CTG GTG ACG CGC GGG C-3'). Una vez que recibimos los cebadores, se procedió a la generación del plásmido mutante (**Figura 4.44**). Para ello, se mezclaron 0.4 µl de plásmido utilizado como molde (50-100 ng/µl), 0.6 µl de cada cebador (10 µM), 0.4 µl de dNTPs, 1.5 µl de la solución QuickChange, 0.5 µl de la enzima QuickChange Lightning y se completó con agua destilada hasta un volumen final de 20 µl. A continuación, se llevó a cabo la reacción en el termociclador con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 2

minutos a 95°C, 18 ciclos de 3 minutos y 30 segundos cada uno (20 segundos a 95°C, 60°C a 10 segundos y 3 minutos a 68°C) y 1 ciclo final de 68°C durante 5 minutos. Una vez finalizada la reacción, se añadió 1 µl de enzima de restricción *Dpn* I durante 1 hora a 37°C para digerir el plásmido molde. Transcurrido este tiempo, se cogieron 2 µl de la mezcla que contiene solamente el plásmido mutante y se siguió el protocolo de clonación de ADN descrito en el siguiente apartado (4.4.12. CLONACIÓN DE ADN EN BACTERIAS) utilizando las bacterias *XL10-Gold Ultracompetent Cells* suministradas por Agilent Technologies para llevar a cabo la transformación.

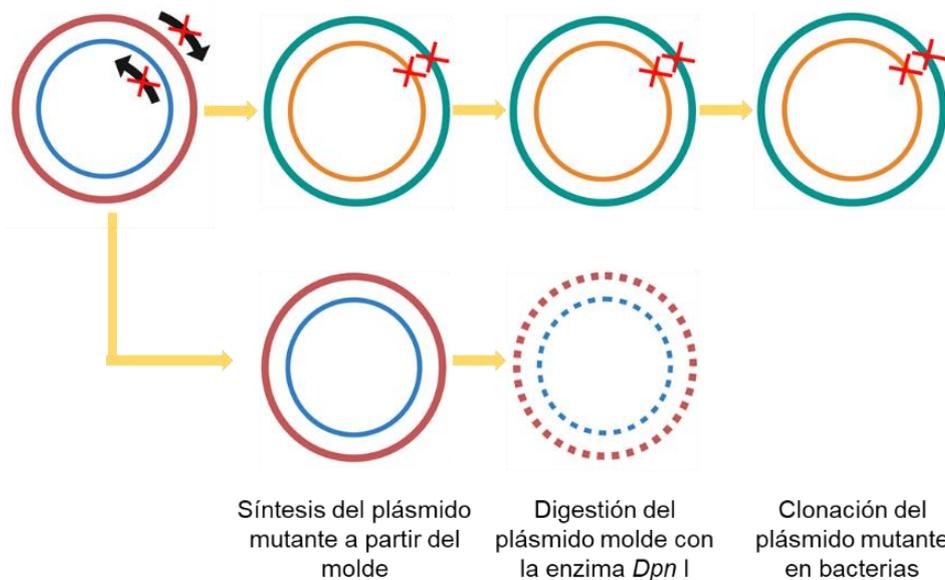


Figura 4.44. Diagrama de los principales pasos que ocurren con el kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis* (Agilent Technologies). Imagen elaborada a partir del fundamento de la técnica.

4.4.12. CLONACIÓN DE ADN EN BACTERIAS

La clonación de genes, también conocida como clonación molecular, es un conjunto de métodos experimentales ampliamente utilizados en biología molecular. Estos métodos se emplean para reproducir moléculas de ADN idénticas dentro de organismos receptores, siendo las bacterias y las levaduras los organismos más comúnmente utilizados. El término "clonación" hace referencia al proceso de copiar una molécula única de ADN a partir de una sola célula viva, generando así una población amplia de células que contienen copias idénticas del ADN original. En un experimento típico de clonación, se introduce en las bacterias un plásmido que contiene el fragmento de ADN de interés mediante un proceso llamado transformación. Posteriormente, las bacterias que han incorporado el plásmido son seleccionadas utilizando antibióticos, permitiendo obtener una población de células que contienen el ADN clonado.

En esta Tesis Doctoral se utilizó la técnica de clonación en bacterias principalmente para ampliar el reservorio de plásmidos necesarios para llevar a cabo algunos experimentos, como el plásmido pCMV14-3xFLAG-MITF empleado los ensayos de sobreexpresión transitoria.

En primer lugar, se empleó el método de choque térmico para llevar a cabo la transformación de la cepa DH5 α de *Escherichia coli*. Este proceso permite incorporar un fragmento de ADN determinado en el interior de la bacteria. Para ello, se mezclaron 20 μ l de la suspensión de estas bacterias, DH5 α Competent Cells de Thermo Scientific (#18265-017), junto con 2 μ l del plásmido de interés en un vial de 1.5 ml y se incubó durante 20 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, rápidamente se puso el vial en un termobloque durante 30 segundos a 42°C y seguidamente se colocó de nuevo en hielo. A continuación, se añadieron 250 μ l de medio S.O.C (*Super Optimal Broth*, Thermo Scientific), un medio de crecimiento bacteriano rico en nutrientes que se utiliza para el cultivo microbiológico, generalmente de *Escherichia coli*. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C con agitación orbital. Luego, se cogieron 140 μ l de la solución de bacterias y se sembraron en una placa de cultivo con agar que contenía ampicilina a una concentración de 0.2 mg/ml como antibiótico de selección. Las bacterias se dejaron crecer durante un día en la estufa de incubación a 37°C. Al día siguiente, se cogió una colonia de bacterias arrastrando una punta de micropipeta estéril sobre el medio de cultivo y se introdujo en un matraz de 250 ml que contenía 200 ml de medio LB (*Luria-Bertani*) suplementado con 0.2 mg/ml de ampicilina. Las bacterias se dejaron crecer durante dos o tres días en la estufa de incubación a 37°C con agitación orbital. Paralelamente se utilizó un matraz que contenía solo medio LB como control negativo. De esta manera, seguimos el crecimiento de nuestra suspensión de bacterias observando el nivel de turbidez del matraz. Cuando el medio con las bacterias mostró un grado de turbidez elevado se cogió la totalidad del volumen de la suspensión y se llevó a cabo la extracción del fragmento de ADN de interés siguiendo las instrucciones del kit *NZYMidiprep* de NZYTech.

4.5. TÉCNICAS DE ESTADÍSTICA

En esta Tesis Doctoral, los resultados de los experimentos se presentan como la media \pm desviación estándar (SD, *standard deviation*) de un conjunto de mediciones realizadas en un rango de 2 a 8 repeticiones, dependiendo del experimento específico. Asimismo, destaca el uso de la técnica de ajuste de regresión lineal. La mayoría de los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando los programas informáticos *SigmaPlot*, *Microsoft Excel* y *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS).

4.5.1. COMPARACIÓN DE DATOS

Los datos biológicos pueden tener distribuciones normales o no normales. Una distribución normal sigue una función de Gauss y se caracteriza por tener una forma de campana simétrica. En una distribución normal, el valor más frecuente coincide con la media (también con la mediana), y la probabilidad de obtener un valor disminuye a medida que se aleja de la media y se acerca a las colas laterales, lo cual se representa mediante la desviación estándar. Para comparar las diferencias estadísticas de los datos con distribución normal, como la comparación de medias entre los diferentes grupos experimentales, se utilizó el método paramétrico de la t de Student. En caso de que los datos no siguieran una distribución normal, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, también conocida como prueba de la U de Mann-Whitney, con el fin de analizar las diferencias entre las medianas de los distintos grupos. En ambos casos, se consideró que existía una diferencia significativa entre los grupos cuando $p < 0.05$. En algunas ocasiones, se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para comparar si un conjunto de datos se ajustaba a una distribución normal o no.

4.5.2. ANÁLISIS DE CORRELACIÓN

Se evaluó la intensidad de la correlación lineal o monótona entre dos variables mediante el cálculo del coeficiente de correlación de Pearson o el coeficiente de correlación de Spearman, en función de la distribución y características de los datos. Estos coeficientes varían en un rango de -1 a +1. Los valores negativos indican una asociación negativa, lo que significa que cuando una variable aumenta, la otra disminuye. Los valores positivos indican una asociación positiva, es decir, que cuando una variable aumenta, la otra también lo hace. Un valor de 0 indica que no existe una correlación lineal o monótona entre las variables. Cuanto más cercano sea el resultado a +1 o -1, más fuerte será la correlación positiva o negativa, respectivamente.

Para los análisis de correlación de expresión entre diferentes genes realizados en esta Tesis Doctoral se utilizó la base de datos del TCGA (*the cancer genome atlas*) mediante el programa *cBioPortal for Cancer Genomics*, el cual permite la visualización, análisis y obtención de datos genómicos a gran escala sobre cáncer. En concreto, se empleó la cohorte “skin cutaneous melanoma (TCGA, PanCancer Atlas)” que contaba con 448 muestras de pacientes con melanoma cutáneo.

4.5.3. ANÁLISIS DE SUPERVIVENCIA

Se utilizó el estimador Kaplan-Meier para analizar la supervivencia de los diferentes grupos experimentales. Este análisis se representa gráficamente mediante una función escalonada que muestra el porcentaje de supervivencia (eje de ordenadas) en función del tiempo (eje de abscisas). El porcentaje de supervivencia puede basarse en la supervivencia total (OS, *overall survival*) o en la supervivencia libre de enfermedad (DFS, *disease free survival*). Estas gráficas permiten visualizar la fracción de individuos que permanecen vivos en cada grupo experimental (grupo control, grupo 1, grupo 2, etc.) en momentos específicos. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Log-Rank utilizando el programa informático *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versión 6.0, y se consideró un criterio de significación de $p < 0,05$ para todas las comparaciones.

En los estudios de supervivencia en animales solo se evaluó el OS, donde el punto de inicio se estableció en el día de la inyección de células tumorales y el punto final fue el día de sacrificio del animal. Los ratones fueron sacrificados de acuerdo con las regulaciones vigentes, que establecen el sacrificio cuando se observan signos de malestar en el animal o cuando el tumor supera un volumen determinado.

4.5.4. ANÁLISIS DE MUTACIONES

Para analizar las secuencias de los genes de interés e identificar las mutaciones generadas mediante el sistema CRISPR/Cas9 se siguió el mismo esquema de trabajo. Los datos obtenidos del fragmento de ADN secuenciado se visualizaron mediante el programa informático *Chromas*, donde se obtuvo el cromatograma de secuencia, el cual nos daba una idea de la resolución de la secuenciación. Cuanto más ruido presenta el cromatograma, menor resolución. El programa *Chromas* también permitió guardar los datos de secuenciación en formato FASTA, un formato de fichero informático basado en texto, para su posterior análisis en el programa ApE (*A plasmid editor*). Tras obtener la secuencia codificadora del gen de interés original mediante la base de datos de *Ensembl genome browser*, utilizamos el ApE para hacer un alineamiento de ambas secuencias

(original y mutada) e identificar la posición de la mutación. A continuación, llevamos a cabo la traducción de la secuencia de ADN mutada a proteína para identificar los cambios generados por la mutación, normalmente la aparición de un codón de parada prematuro.

4.5.5. ANÁLISIS DE DATOS DE ChIP-seq

En la base de datos de Cistrome, donde se recopilan datos de accesibilidad de ChIP-seq y cromatina, se utilizó una herramienta bioinformática muy útil para los estudios de regulación epigenética y transcripción, *Cistrome Data Browser*. Este programa fue utilizado para comparar los datos de ChIP-seq disponibles de diferentes líneas celulares y realizar estudios de enriquecimiento para determinados genes. Asimismo, estos datos de ChIP-seq fueron analizados mediante la herramienta *Genome Browser* de la Universidad de California en Santa Cruz (UCSC) para identificar los sitios de unión de determinados factores de transcripción en sitios específicos del genoma.

Capítulo 5

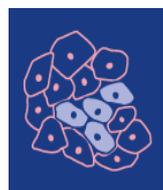
Resultados y discusión

«El éxito está justo después de ese momento en el que quieres rendirte»

Eliud Kipchoge

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ACRIFLAVINA, UN POTENTE INHIBIDOR DE HIF-1 α , ALTERA EL METABOLISMO DE LA GLUCOSA Y SUPRIME LAS VÍAS PROTECTORAS DE ATF4 EN EL MELANOMA EN CONDICIONES NO HIPÓXICAS



cancers

Los resultados del estudio del efecto de la acriflavina, un potente inhibidor de HIF-1 α , sobre el metabolismo de la glucosa y las vías protectoras de ATF4 en el melanoma en condiciones con presencia de oxígeno se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/1/102>

5.1.1. TÍTULO

Acriflavine, a potent inhibitor of HIF-1 α , disturbs glucose metabolism and suppresses ATF4-protective pathways in melanoma under non-hypoxic conditions.

5.1.2. AUTORES

Román Martí-Díaz¹, María F. Montenegro¹, Juan Cabezas-Herrera², Colin R. Goding³, José Neptuno Rodríguez-López¹ y Luis Sánchez-del-Campo¹.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

²Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

³Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, Universidad de Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, Reino Unido.

5.1.3. REFERENCIA

Cancers (2020), 13, 102. <https://doi.org/10.3390/cancers13010102>

5.1.4. RESUMEN

El factor inducible por hipoxia (HIF-1 α) se expresa de forma constitutiva en células de melanoma en condiciones normales de oxígeno (normoxia) y su elevada expresión se correlaciona con la agresividad de los tumores de melanoma. En este estudio, utilizamos la acriflavina, un potente inhibidor de la dimerización de HIF-1 α , como herramienta para investigar si las vías reguladas por HIF-1 α contribuyen al crecimiento de las células de melanoma en normoxia. Observamos que la acriflavina afectaba de forma diferencial a las dianas moleculares reguladas por HIF-1 α en melanoma bajo condiciones de normoxia. Si bien el tratamiento con la acriflavina aumentaba la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), también reducía significativamente la expresión de la piruvato deshidrogenasa quinasa 1 (PDK1), una diana bien conocida de HIF-1 α . Consecuentemente, la disminución de PDK1, debido a la acriflavina redujo la disponibilidad de glucosa y suprimió el efecto Warburg en las células de melanoma. Además, al bloquear la fosforilación de AKT y RSK2, la acriflavina también evitó las vías protectoras necesarias para la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo. En este sentido, demostramos que la acriflavina activaba la degradación del factor de transcripción activador 4 (ATF4) a través del proteasoma y, al mismo tiempo, reducía la expresión del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF), un regulador clave en el desarrollo de los melanocitos y un oncogén en el melanoma. Dado que el tratamiento con la acriflavina provoca la muerte de las células de melanoma, nuestros resultados sugieren que la inhibición de la función de HIF-1 α en el melanoma podría ofrecer nuevas posibilidades en el tratamiento de esta enfermedad, independientemente de la presencia de hipoxia en el tumor.

5.2. EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ASOCIADO A MICROFTALMIA (MITF) INDUCE EL ESCAPE DEL SISTEMA INMUNE INNATO EN EL MELANOMA



Journal of
Experimental &
Clinical Cancer
Research

Los resultados del estudio de la función del factor de transcripción asociado a microftalmia (MITF) sobre la evasión del sistema inmunitario innato en el melanoma se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: <https://jeccr.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13046-021-01916-8>

5.2.1. TÍTULO

MITF induces escape from innate immunity in melanoma.

5.2.2. AUTORES

Luis Sánchez-del-Campo^{1*}, Román Martí-Díaz^{1*}, María F. Montenegro¹, Rebeca González-Guerrero¹, Trinidad Hernández-Caselles⁴, Enrique Martínez-Barba⁵, Antonio Piñero-Madrona⁶, Juan Cabezas-Herrera², Colin R. Goding³ y José Neptuno Rodríguez-López¹.

*Autores principales.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

²Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

³Ludwig Institute for Cancer Research, Nuffield Department of Clinical Medicine, Universidad de Oxford, Headington, Oxford OX3 7DQ, Reino Unido.

⁴Departamento de Bioquímica y Biología Molecular B e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

⁵Departamento de Patología, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

⁶Departamento de Cirugía, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

5.2.3. REFERENCIA

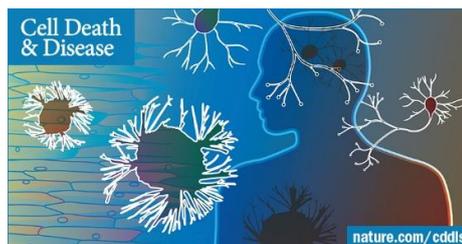
Journal of Experimental & Clinical Cancer Research (2021) *CR*, 40, 117.

<https://doi.org/10.1186/s13046-021-01916-8>

5.2.4. RESUMEN

El uso de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento del cáncer. Sin embargo, aún se desconoce cómo el sistema inmune responde ante la diversidad fenotípica presente en los tumores. En el caso del melanoma, uno de los principales determinantes de la identidad fenotípica es el oncogén de supervivencia de linaje MITF, que integra diversas señales microambientales para coordinar procesos implicados en la fisiopatología del melanoma y que incluyen su supervivencia, la evasión de la senescencia, la diferenciación, la proliferación, la invasión, el metabolismo y la reparación de daños en el ADN. Sin embargo, hasta hoy se desconoce el papel de MITF en la respuesta inmunitaria. Mediante el uso de varios modelos de melanoma de ratón, exploramos el posible papel de MITF en la modulación de la respuesta inmune contra el melanoma. Se emplearon técnicas como CHIP-seq, Western blot, microscopía confocal, edición genómica mediante CRISPR/Cas9 y pruebas de luciferasa, entre otras, para determinar los mecanismos subyacentes por los que la plasticidad fenotípica impulsada por MITF modula la respuesta mediada por células NK en melanoma. Los resultados mostraron que MITF regulaba la expresión de ADAM10, una enzima que corta los ligandos MIC-A/B, claves para la interacción con las células NK. Mediante el control del reconocimiento del melanoma por las células NK, MITF es capaz de regular la respuesta del melanoma al sistema inmunitario innato. En consecuencia, mientras que las células de melanoma con bajos niveles de expresión de MITF pueden ser eliminadas eficientemente por las células NK, las células de melanoma con una mayor expresión de MITF logran escapar a la vigilancia de las células NK. Como conclusión, nuestros resultados indican que la modulación de MITF es un factor significativo en la respuesta inmune contra el melanoma que debería ser tenido en cuenta al aplicar terapias inmunitarias específicas para el tratamiento del melanoma.

5.3. EL BLOQUEO DE LA METILACIÓN DE PROTEÍNAS EN CÉLULAS DE CÁNCER DE PÁNCREAS RESULTA EN EL DESEQUILIBRIO DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR KRAS Y LA INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA



Los resultados del estudio en relación con la modulación de la metilación de proteínas sobre la ruta de señalización mediada por KRAS y el proceso de autofagia en cáncer de páncreas se recogen en la publicación que se adjunta.

URL: <https://www.nature.com/articles/s41419-023-06288-9>

5.3.1. TÍTULO

Targeting protein methylation in pancreatic cancer cells results in KRAS signaling imbalance and inhibition of autophagy.

5.3.2. AUTORES

María F. Montenegro^{1*}, Román Martí-Díaz^{1*}, Ana Navarro³, Jorge Tolvía³, Luis Sánchez-del-Campo¹, Juan Cabezas-Herrera² y José Neptuno Rodríguez-López¹.

*Autores principales.

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, 30100, Murcia, España.

²Grupo de investigación de Terapias Moleculares y Biomarcadores de Tumores Sólidos, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), 30120, Murcia, España.

³Departamento de Morfología y Biología Celular, Universidad de Oviedo, Grupo GECYEN del Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA), Oviedo, Asturias, España.

5.3.3. REFERENCIA

Cell Death & Disease (2023), 14, 761. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06288-9>

5.3.4. RESUMEN

Las células de cáncer de páncreas con mutaciones en *KRAS* requieren de una elevada autofagia basal para su crecimiento y viabilidad. En este trabajo, observamos cómo algunos de los procesos que permiten el mantenimiento de esa autofagia basal en las células de cáncer de páncreas están mediados por la metilación de proteínas. Así, la metilación de proteínas como PP2A y MRAS sustenta la actividad autofágica de dichas células. La interrupción de la metilación de proteínas utilizando un tratamiento hipometilante (HMT), que agota los niveles celulares de S-adenosilmetionina al mismo tiempo que induce la acumulación de S-adenosilhomocisteína, resulta en la inhibición de la autofagia y en la activación de estrés del retículo endoplásmico en las células de cáncer de páncreas. Las condiciones de hipometilación a través de la reducción de la localización en membrana de MRAS, producen un desequilibrio en la señalización de KRAS, lo que provoca la inactivación parcial de ERK y la sobreactivación de la ruta PI3K/AKT-mTORC1. Así, el tratamiento HMT impide la activación de CRAF mediante la disrupción del complejo ternario SHOC2 (SHOC2/MRAS/PP1), el cual actúa como una holofosfatasa CRAF-S259. Los procesos de desmetilación que resultan en la inactivación de PP2A también favorecen la inhibición de la autofagia bloqueando la activación de ULK1 a la vez que restablecen la retención citoplasmática de los factores de transcripción MIT/TFE. Dado que la autofagia permite a las células de cáncer de páncreas la plasticidad metabólica necesaria para hacer frente a diferentes condiciones de estrés, mientras que al mismo tiempo promueve su patogénesis y resistencia a inhibidores de la ruta de KRAS, esta terapia hipometilante, podría representar una estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer de páncreas.

Capítulo 6

Conclusiones

*«Cuanto más difícil es la victoria, mayor es
la felicidad de ganar»*

Pelé

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

6.1. CONCLUSIONES

1. La acriflavina inhibe la dimerización de HIF-1 en el melanoma en condiciones de normoxia y afecta de forma diferencial a la expresión de sus dianas moleculares GLUT1, PDK1 y VEGF. Como consecuencia, el tratamiento con acriflavina provoca una disminución en la entrada y disponibilidad de la glucosa y la consecuente supresión del efecto Warburg.
2. La acriflavina inhibe la fosforilación de AKT y RSK2 bloqueando las respuestas necesarias para la supervivencia de las células de melanoma en condiciones de estrés mediante la reducción de la expresión de MITF y ATF4.
3. El tratamiento de las células de melanoma con acriflavina provoca daño en el ADN y muerte celular por apoptosis, lo que sugiere que la inhibición de HIF-1 α en melanoma podría suponer una terapia efectiva, independientemente de las condiciones de hipoxia en el tumor.
4. Demostramos por primera vez que MITF regula de forma directa la expresión de ADAM10 en células de melanoma mediante su unión al promotor en la secuencia consenso CACGTG (E-box).
5. Nuestros resultados han identificado el papel clave de MITF en la muerte celular mediada por las células NK a través de la regulación de la expresión de la proteasa ADAM10, implicada en la presentación de los ligandos de NKG2D en la superficie de las células de melanoma.
6. Demostramos la doble función de MITF en la modulación de la respuesta inmune anti-melanoma: por un lado, activando la respuesta de los linfocitos T y, por otro lado, bloqueando la muerte celular mediada por las células NK.
7. El papel de MITF en la regulación de ADAM10 junto con su participación en la respuesta inmune contra el melanoma permiten proponer el uso de inhibidores específicos de ADAM10 como una estrategia novedosa complementaria a las actuales inmunoterapias.

8. El tratamiento hipometilante (HMT) conlleva una disminución de los niveles de metilación de proteínas, produciendo un desequilibrio en la señalización de KRAS en células de cáncer de páncreas, lo que provoca la inactivación parcial de la ruta MAPK y la sobreactivación de la ruta PI3K/AKT-mTORC1.
9. La disminución de la actividad de PP2A inducida por la combinación HMT provoca una alteración en la translocación al núcleo de los factores MiT/TFE y una disminución de la actividad de ULK1, necesarias para la activación de la autofagia en cáncer de páncreas.
10. El tratamiento de las células de cáncer de páncreas con HMT reduce la localización en membrana de MRAS alterando el complejo SHOC2 (SHOC2/MRAS/PP1) e impide la activación de CRAF.
11. Proponemos el control de la metilación de proteínas como una nueva estrategia frente al cáncer de páncreas en base a su capacidad de activar la respuesta a estrés del retículo endoplásmico y apoptosis, a la vez de inhibir la autofagia. Así, el tratamiento HMT podría evitar la plasticidad metabólica frente a condiciones de estrés, además de la patogénesis y la resistencia a inhibidores de la ruta KRAS en este tipo de cáncer.

6.2. CONCLUSIONS

1. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization in melanoma under normoxic conditions and differentially affects the expression of its molecular targets GLUT1, PDK1 and VEGF. Consequently, acriflavine treatment leads to a reduction in glucose uptake and availability, resulting in the suppression of the Warburg effect.
2. Acriflavine inhibits AKT and RSK2 phosphorylation blocking responses necessary for melanoma cell survival under stress conditions by reducing MITF and ATF4 expression.
3. Treatment of melanoma cells with acriflavine results in DNA damage and apoptotic cell death, indicating that HIF-1 α inhibition in melanoma may be an effective therapy regardless of hypoxic conditions in tumours.
4. We demonstrate for the first time that MITF regulates ADAM10 expression in melanoma cells by binding directly to the promoter at the CACGTG (E-box) consensus sequence.
5. Our results have identified the key role of MITF in NK cell-mediated cell death by controlling the expression of ADAM10, a protease involved in the presentation of NKG2D ligands on the surface of melanoma cells.
6. We reveal the dual function of MITF in modulating the anti-melanoma immune response. On the one hand, MITF can activate T lymphocyte responses, while on the other hand it can inhibit NK cell-mediated cell death.
7. The role of MITF in the regulation of ADAM10 together with its involvement in the immune response against melanoma allows us to propose the use of specific ADAM10 inhibitors as a novel complementary strategy to current immunotherapies.
8. Hypomethylating treatment (HMT) decreases protein methylation levels, which leads to an imbalance in KRAS signalling in pancreatic cancer cells, resulting in partial inactivation of the MAPK pathway and overactivation of the PI3K/AKT-mTORC1 pathway.

- 9.** The decrease in PP2A activity induced by the HMT combination causes an alteration in the translocation to the nucleus of MiT/TFE factors and a decrease in ULK1 activity, which are necessary for the activation of autophagy in pancreatic cancer.

- 10.** Treating pancreatic cancer cells with HMT reduces MRAS membrane localisation by disrupting the SHOC2 complex (SHOC2/MRAS/PP1) and prevents CRAF activation.

- 11.** We propose the control of protein methylation as a new strategy against pancreatic cancer based on its ability to activate the endoplasmic reticulum stress response and apoptosis, while inhibiting autophagy. Thus, HMT treatment could prevent metabolic plasticity under stress conditions, as well as pathogenesis and resistance to KRAS pathway inhibitors in this type of cancer.

Capítulo 7

Bibliografía

*«Sigue trabajando, sigue esforzándote,
nunca te rindas; cae siete veces, levántate
ocho. La comodidad es una amenaza mayor
para el progreso que las dificultades»*

Denzel Washington

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Malek, Z. A., Swope, V. B., Starner, R. J., Koikov, L., Cassidy, P., & Leachman, S. (2014). Melanocortins and the melanocortin 1 receptor, moving translationally towards melanoma prevention. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 563, 4-12. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.002>
- Ahmed, F., & Haass, N. K. (2018). Microenvironment-Driven Dynamic Heterogeneity and Phenotypic Plasticity as a Mechanism of Melanoma Therapy Resistance. *Frontiers in Oncology*, 8, 173. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00173>
- Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(8), 1659-1670. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2146-9>
- Almåsbaek, H., Aarvak, T., & Vemuri, M. C. (2016). CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *Journal of Immunology Research*, 2016, 5474602. <https://doi.org/10.1155/2016/5474602>
- Almuhaideb, A., Papatheasiou, N., & Bomanji, J. (2011). 18F-FDG PET/CT Imaging In Oncology. *Annals of Saudi Medicine*, 31(1), 3-13. <https://doi.org/10.4103/0256-4947.75771>
- Amaravadi, R. K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X. M., Weiss, W. A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R. S., Lotze, M. T., & White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(4), 654-666. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2634>
- Anderson, M. E. (1998). Glutathione: An overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112, 1-14. [https://doi.org/10.1016/s0009-2797\(97\)00146-4](https://doi.org/10.1016/s0009-2797(97)00146-4)
- Andersson, E. R., & Lendahl, U. (2014). Therapeutic modulation of Notch signalling—Are we there yet? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 13(5), 357-378. <https://doi.org/10.1038/nrd4252>
- Arnheiter, H. (2010). The discovery of the microphthalmia locus and its gene, *Mitf*. *Pigment cell & melanoma research*, 23(6), 729-735. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00759.x>
- Baeriswyl, V., & Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*, 19(5), 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2009.05.003>
- Bailey, P., Chang, D. K., Nones, K., Johns, A. L., Patch, A. M., Gingras, M. C., Miller, D. K., Christ, A. N., Bruxner, T. J. C., Quinn, M. C., Nourse, C., Murtaugh, L. C., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Manning, S., Nourbakhsh, E., Wani, S., Fink, L., Holmes, O., ... Grimmond, S. M. (2016). Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature*, 531(7592), 47-52. <https://doi.org/10.1038/nature16965>

- Balamurugan, K. (2016). HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *International Journal of Cancer*, 138(5), 1058-1066. <https://doi.org/10.1002/ijc.29519>
- Ballantyne, A. D., & Garnock-Jones, K. P. (2013). Dabrafenib: First global approval. *Drugs*, 73(12), 1367-1376. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0095-2>
- Ballotti, R., Cheli, Y., & Bertolotto, C. (2020). The complex relationship between MITF and the immune system: A Melanoma ImmunoTherapy (response) Factor? *Molecular Cancer*, 19(1), Article 1. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01290-7>
- Bardeesy, N., Cheng, K. H., Berger, J. H., Chu, G. C., Pahler, J., Olson, P., Hezel, A. F., Horner, J., Lauwers, G. Y., Hanahan, D., & DePinho, R. A. (2006). Smad4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer. *Genes & Development*, 20(22), 3130-3146. <https://doi.org/10.1101/gad.1478706>
- Bauer, J., & Garbe, C. (2003). Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Research*, 16(3), 297-306. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00047.x>
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science (New York, N. Y.)*, 285(5428), 727-729. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.727>
- Baylin, S. B., & Jones, P. A. (2016). Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(9), a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
- Bemis, L. T., Chen, R., Amato, C. M., Classen, E. H., Robinson, S. E., Coffey, D. G., Erickson, P. F., Shellman, Y. G., & Robinson, W. A. (2008). MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Research*, 68(5), 1362-1368. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2912>
- Benavides, F. J., & Guénet, J. L. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá, Madrid. <https://secal.es/wp-content/uploads/2014/10/00-GENETICA-indice.pdf.pdf>
- Bennett, D. C. (1983). Differentiation in mouse melanoma cells: Initial reversibility and an on-off stochastic model. *Cell*, 34(2), 445-453. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90378-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90378-1)
- Bennett, D. C. (2016). Genetics of melanoma progression: The rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 29(2), 122-140. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12422>
- Berdasco, M., & Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Developmental Cell*, 19(5), 698-711. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.10.005>
- Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de Lichy, M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., Maubec, E., de la Fouchardière, A., Molinié, V., Vabres, P., Dalle, S., Poulalhon, N., Martin-Denavit, T., Thomas, L., Andry-Benzaquen, P., ... Bressac-de

- Paillerets, B. (2011). A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, *480*(7375), 94-98. <https://doi.org/10.1038/nature10539>
- Bianchi-Smiraglia, A., Bagati, A., Fink, E. E., Moparthy, S., Wawrzyniak, J. A., Marvin, E. K., Battaglia, S., Jowdy, P., Kolesnikova, M., Foley, C. E., Berman, A. E., Kozlova, N. I., Lipchick, B. C., Paul-Rosner, L. M., Bshara, W., Ackroyd, J. J., Shewach, D. S., & Nikiforov, M. A. (2017). Microphthalmia-associated transcription factor suppresses invasion by reducing intracellular GTP pools. *Oncogene*, *36*(1), 84-96. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.178>
- Birch, J., & Gil, J. (2020). Senescence and the SASP: Many therapeutic avenues. *Genes & Development*, *34*(23-24), 1565-1576. <https://doi.org/10.1101/gad.343129.120>
- Boedtker, E., & Pedersen, S. F. (2020). The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology*, *82*, 103-126. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034627>
- Bommareddy, P. K., Patel, A., Hossain, S., & Kaufman, H. L. (2017). Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *American Journal of Clinical Dermatology*, *18*(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0238-9>
- Borroni, E. M., & Grizzi, F. (2021). Cancer Immunoediting and beyond in 2021. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(24), 13275. <https://doi.org/10.3390/ijms222413275>
- Bose, S., Zhang, C., & Le, A. (2021). Glucose Metabolism in Cancer: The Warburg Effect and Beyond. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *1311*, 3-15. https://doi.org/10.1007/978-3-030-65768-0_1
- Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., & Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily—CTLA-4. *Nature*, *328*(6127), 267-270. <https://doi.org/10.1038/328267a0>
- Bryant, K. L., Stalneck, C. A., Zeitouni, D., Klomp, J. E., Peng, S., Tikunov, A. P., Gunda, V., Pierobon, M., Waters, A. M., George, S. D., Tomar, G., Papke, B., Hobbs, G. A., Yan, L., Hayes, T. K., Diehl, J. N., Goode, G. D., Chaika, N. V., Wang, Y., ... Der, C. J. (2019). Combination of ERK and autophagy inhibition as a treatment approach for pancreatic cancer. *Nature Medicine*, *25*(4), 628-640. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0368-8>
- Buscail, L., Bournet, B., & Cordelier, P. (2020). Role of oncogenic KRAS in the diagnosis, prognosis and treatment of pancreatic cancer. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, *17*(3), 153-168. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0245-4>
- Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2011). Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *10*(6), 417-427. <https://doi.org/10.1038/nrd3455>

- Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S. A., Galibert, M.-D., Denat, L., Larue, L., & Goding, C. R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*, *433*(7027), 764-769. <https://doi.org/10.1038/nature03269>
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., & Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & Development*, *20*(24), 3426-3439. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>
- Carusillo, A., & Mussolino, C. (2020). DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*, *9*(7), 1665. <https://doi.org/10.3390/cells9071665>
- Cavuto, P., & Fenech, M. F. (2012). A review of methionine dependency and the role of methionine restriction in cancer growth control and life-span extension. *Cancer Treatment Reviews*, *38*(6), 726-736. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2012.01.004>
- Cellarier, E., Durando, X., Vasson, M. P., Farges, M. C., Demiden, A., Maurizis, J. C., Madelmont, J. C., & Chollet, P. (2003). Methionine dependency and cancer treatment. *Cancer Treatment Reviews*, *29*(6), 489-499. [https://doi.org/10.1016/s0305-7372\(03\)00118-x](https://doi.org/10.1016/s0305-7372(03)00118-x)
- Chaffer, C. L., Thompson, E. W., & Williams, E. D. (2007). Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells, Tissues, Organs*, *185*(1-3), 7-19. <https://doi.org/10.1159/000101298>
- Chapman, P. B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J. B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S. J., Sosman, J. A., Kirkwood, J. M., ... BRIM-3 Study Group. (2011). Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2507-2516. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103782>
- Cheli, Y., Ohanna, M., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *23*(1), 27-40. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x>
- Chen, D. S., & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity*, *39*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.07.012>
- Chin, L., Artandi, S. E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S. L., Gottlieb, G. J., Greider, C. W., & DePinho, R. A. (1999). P53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis. *Cell*, *97*(4), 527-538. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80762-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80762-x)
- Choi, S. R., Yang, Y., Huang, K. Y., Kong, H. J., Flick, M. J., & Han, B. (2020). Engineering of biomaterials for tumor modeling. *Materials Today. Advances*, *8*, 100117. <https://doi.org/10.1016/j.mtadv.2020.100117>

- Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: The precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, *15*(12), 1147-1165. [https://doi.org/10.1016/s0046-8177\(84\)80310-x](https://doi.org/10.1016/s0046-8177(84)80310-x)
- Coe, E. A., Tan, J. Y., Shapiro, M., Louphrasitthiphol, P., Bassett, A. R., Marques, A. C., Goding, C. R., & Vance, K. W. (2019). The MITF-SOX10 regulated long non-coding RNA DIRC3 is a melanoma tumour suppressor. *PLoS Genetics*, *15*(12), e1008501. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008501>
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J. L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., Bennouna, J., Bachet, J. B., Khemissa-Akouz, F., Péré-Vergé, D., Delbaldo, C., Assenat, E., Chauffert, B., Michel, P., Montoto-Grillot, C., ... PRODIGE Intergroup. (2011). FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England Journal of Medicine*, *364*(19), 1817-1825. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1011923>
- Conroy, T., Hammel, P., Hebbar, M., Ben Abdelghani, M., Wei, A. C., Raoul, J. L., Choné, L., Francois, E., Artru, P., Biagi, J. J., Lecomte, T., Assenat, E., Faroux, R., Ychou, M., Volet, J., Sauvanet, A., Breysacher, G., Di Fiore, F., Cripps, C., ... Canadian Cancer Trials Group and the Unicancer-GI-PRODIGE Group. (2018). FOLFIRINOX or Gemcitabine as Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *379*(25), 2395-2406. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1809775>
- Coulie, P. G., Van den Eynde, B. J., van der Bruggen, P., & Boon, T. (2014). Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, *14*(2), 135-146. <https://doi.org/10.1038/nrc3670>
- Cox, A. D., Der, C. J., & Phillips, M. R. (2015). Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(8), 1819-1827. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3214>
- Cui, R., Widlund, H. R., Feige, E., Lin, J. Y., Wilensky, D. L., Igras, V. E., D'Orazio, J., Fung, C. Y., Schanbacher, C. F., Granter, S. R., & Fisher, D. E. (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*, *128*(5), 853-864. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.12.045>
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., & Adams, J. M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *15*(1), 49-63. <https://doi.org/10.1038/nrm3722>
- Damgaci, S., Ibrahim-Hashim, A., Enriquez-Navas, P. M., Pilon-Thomas, S., Guvenis, A., & Gillies, R. J. (2018). Hypoxia and acidosis: Immune suppressors and therapeutic targets. *Immunology*, *154*(3), 354-362. <https://doi.org/10.1111/imm.12917>

- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, *417*(6892), 949-954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- Davis, E. J., Johnson, D. B., Sosman, J. A., & Chandra, S. (2018). Melanoma: What do all the mutations mean? *Cancer*, *124*(17), 3490-3499. <https://doi.org/10.1002/cncr.31345>
- Debnath, P., Huiem, R. S., Dutta, P., & Palchaudhuri, S. (2021). Epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors. *Bioscience Reports*, *42*(1), BSR20211754. <https://doi.org/10.1042/BSR20211754>
- Degenhardt, K., Chen, G., Lindsten, T., & White, E. (2002). BAX and BAK mediate p53-independent suppression of tumorigenesis. *Cancer Cell*, *2*(3), 193-203. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00126-5](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00126-5)
- DeNardo, D. G., Andreu, P., & Coussens, L. M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Reviews*, *29*(2), 309-316. <https://doi.org/10.1007/s10555-010-9223-6>
- Dessinioti, C., & Stratigos, A. J. (2022). An Epidemiological Update on Indoor Tanning and the Risk of Skin Cancers. *Current Oncology (Toronto, Ont.)*, *29*(11), 8886-8903. <https://doi.org/10.3390/curroncol29110699>
- Dhatchinamoorthy, K., Colbert, J. D., & Rock, K. L. (2021). Cancer Immune Evasion Through Loss of MHC Class I Antigen Presentation. *Frontiers in Immunology*, *12*, 636568. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.636568>
- Didona, D., Paolino, G., Bottoni, U., & Cantisani, C. (2018). Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. *Biomedicines*, *6*(1), 6. <https://doi.org/10.3390/biomedicines6010006>
- Dillekås, H., Rogers, M. S., & Straume, O. (2019). Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, *8*(12), 5574-5576. <https://doi.org/10.1002/cam4.2474>
- Dodig, S., Čepelak, I., & Pavić, I. (2019). Hallmarks of senescence and aging. *Biochemia Medica*, *29*(3), 030501. <https://doi.org/10.11613/BM.2019.030501>
- Domingues, B., Lopes, J. M., Soares, P., & Pópulo, H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and Therapy*, *7*, 35-49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
- Dongre, A., & Weinberg, R. A. (2019). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *20*(2), 69-84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- Donizy, P., Zietek, M., Leskiewicz, M., Halon, A., & Matkowski, R. (2015). High Percentage of ADAM-10 Positive Melanoma Cells Correlates with Paucity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes

- but Does Not Predict Prognosis in Cutaneous Melanoma Patients. *Analytical Cellular Pathology (Amsterdam)*, 2015, 975436. <https://doi.org/10.1155/2015/975436>
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews. Cancer*, 3(1), 11-22. <https://doi.org/10.1038/nrc969>
- Drosten, M., & Barbacid, M. (2020). Targeting the MAPK Pathway in KRAS-Driven Tumors. *Cancer Cell*, 37(4), 543-550. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.013>
- Drozdowski, R., Spaccarelli, N., Peters, M. S., & Grant-Kels, J. M. (2023). Dysplastic nevus part I: Historical perspective, classification, and epidemiology. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 88(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.04.068>
- Duan, S., Guo, W., Xu, Z., He, Y., Liang, C., Mo, Y., Wang, Y., Xiong, F., Guo, C., Li, Y., Li, X., Li, G., Zeng, Z., Xiong, W., & Wang, F. (2019). Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Molecular Cancer*, 18(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0956-8>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2004.07.017>
- Durrant, D. E., & Morrison, D. K. (2018). Targeting the Raf kinases in human cancer: The Raf dimer dilemma. *British Journal of Cancer*, 118(1), 3-8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.399>
- Dvorak, H. F. (2019). Tumors: Wounds That Do Not Heal-A Historical Perspective with a Focus on the Fundamental Roles of Increased Vascular Permeability and Clotting. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 45(6), 576-592. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1687908>
- Dzutsev, A., Badger, J. H., Perez-Chanona, E., Roy, S., Salcedo, R., Smith, C. K., & Trinchieri, G. (2017). Microbes and Cancer. *Annual Review of Immunology*, 35, 199-228. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-051116-052133>
- Ellis, C., Ramzy, A., & Kieffer, T. J. (2017). Regenerative medicine and cell-based approaches to restore pancreatic function. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(10), 612-628. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2017.93>
- Faget, D. V., Ren, Q., & Stewart, S. A. (2019). Unmasking senescence: Context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 19(8), 439-453. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0156-2>
- Falletta, P., Sanchez-Del-Campo, L., Chauhan, J., Efferm, M., Kenyon, A., Kershaw, C. J., Siddaway, R., Lisle, R., Freter, R., Daniels, M. J., Lu, X., Tüting, T., Middleton, M., Buffa, F.

- M., Willis, A. E., Pavitt, G., Ronai, Z. A., Sauka-Spengler, T., Hölzel, M., & Goding, C. R. (2017). Translation reprogramming is an evolutionarily conserved driver of phenotypic plasticity and therapeutic resistance in melanoma. *Genes & Development*, *31*(1), 18-33. <https://doi.org/10.1101/gad.290940.116>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: A hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *5*(1), 28. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fedorenko, I. V., Gibney, G. T., & Smalley, K. S. M. (2013). NRAS mutant melanoma: Biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*, *32*(25), 3009-3018. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.453>
- Feige, E., Yokoyama, S., Levy, C., Khaled, M., Igras, V., Lin, R. J., Lee, S., Widlund, H. R., Granter, S. R., Kung, A. L., & Fisher, D. E. (2011). Hypoxia-induced transcriptional repression of the melanoma-associated oncogene MITF. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(43), E924-933. <https://doi.org/10.1073/pnas.1106351108>
- Ferguson, J., Smith, M., Zudaire, I., Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2017). Glucose availability controls ATF4-mediated MITF suppression to drive melanoma cell growth. *Oncotarget*, *8*(20), 32946-32959. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16514>
- Ferrari de Andrade, L., Tay, R. E., Pan, D., Luoma, A. M., Ito, Y., Badrinath, S., Tsoucas, D., Franz, B., May, K. F., Harvey, C. J., Kobold, S., Pyrdol, J. W., Yoon, C., Yuan, G. C., Hodi, F. S., Dranoff, G., & Wucherpennig, K. W. (2018). Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6383), 1537-1542. <https://doi.org/10.1126/science.aao0505>
- Fidler, I. J., Gruys, E., Cifone, M. A., Barnes, Z., & Bucana, C. (1981). Demonstration of multiple phenotypic diversity in a murine melanoma of recent origin. *Journal of the National Cancer Institute*, *67*(4), 947-956.
- Fink, C., & Haenssle, H. A. (2017). Non-invasive tools for the diagnosis of cutaneous melanoma. *Skin Research and Technology: Official Journal of International Society for Bioengineering and the Skin (ISBS) [and] International Society for Digital Imaging of Skin (ISDIS) [and] International Society for Skin Imaging (ISSI)*, *23*(3), 261-271. <https://doi.org/10.1111/srt.12350>
- Flaherty, K. T. (2012). Targeting metastatic melanoma. *Annual Review of Medicine*, *63*, 171-183. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050410-105655>
- Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., Kudchadkar, R., Burris, H. A., Falchook, G., Algazi, A., Lewis, K., Long, G. V., Puzanov, I., Lebowitz, P., Singh, A., ... Weber, J. (2012). Combined

- BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *The New England Journal of Medicine*, 367(18), 1694-1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1210093>
- Flaherty, K. T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L. V., Hassel, J. C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J. M. G., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M. R., Becker, J. C., Casey, M., ... METRIC Study Group. (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 367(2), 107-114. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1203421>
- Flockhart, R. J., Webster, D. E., Qu, K., Mascarenhas, N., Kovalski, J., Kretz, M., & Khavari, P. A. (2012). BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANCER to regulate melanoma cell migration. *Genome Research*, 22(6), 1006-1014. <https://doi.org/10.1101/gr.140061.112>
- Friedberg, E. C. (2003). DNA damage and repair. *Nature*, 421(6921), 436-440. <https://doi.org/10.1038/nature01408>
- Friedman, R. J., Rigel, D. S., & Kopf, A. W. (1985). Early detection of malignant melanoma: The role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 35(3), 130-151. <https://doi.org/10.3322/canjclin.35.3.130>
- Gameiro, P. A., & Struhl, K. (2018). Nutrient Deprivation Elicits a Transcriptional and Translational Inflammatory Response Coupled to Decreased Protein Synthesis. *Cell Reports*, 24(6), 1415-1424. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.07.021>
- Gangemi, R., Amaro, A., Gino, A., Barisione, G., Fabbi, M., Pfeffer, U., Brizzolara, A., Queirolo, P., Salvi, S., Boccardo, S., Gualco, M., Spagnolo, F., Jager, M. J., Mosci, C., Rossello, A., & Ferrini, S. (2014). ADAM10 correlates with uveal melanoma metastasis and promotes in vitro invasion. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 27(6), 1138-1148. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12306>
- Garbe, C., & Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clinics in Dermatology*, 27(1), 3-9. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.001>
- Garber, J. E., & Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(2), 276-292. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.042>
- Garibyan, L., & Fisher, D. E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Current Oncology Reports*, 12(5), 319-326. <https://doi.org/10.1007/s11912-010-0119-y>
- Giacinti, C., & Giordano, A. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-5227. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>
- Giuliano, S., Cheli, Y., Ohanna, M., Bonet, C., Beuret, L., Bille, K., Loubat, A., Hofman, V., Hofman, P., Ponzio, G., Bahadoran, P., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2010). Microphthalmia-

- associated transcription factor controls the DNA damage response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Research*, 70(9), 3813-3822. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2913>
- Goding, C. R., & Arnheiter, H. (2019). MITF-the first 25 years. *Genes & Development*, 33(15-16), 983-1007. <https://doi.org/10.1101/gad.324657.119>
- Goodall, J., Carreira, S., Denat, L., Kobi, D., Davidson, I., Nuciforo, P., Sturm, R. A., Larue, L., & Goding, C. R. (2008). Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells. *Cancer Research*, 68(19), 7788-7794. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1053>
- Gorgoulis, V., Adams, P. D., Alimonti, A., Bennett, D. C., Bischof, O., Bishop, C., Campisi, J., Collado, M., Evangelou, K., Ferbeyre, G., Gil, J., Hara, E., Krizhanovsky, V., Jurk, D., Maier, A. B., Narita, M., Niedernhofer, L., Passos, J. F., Robbins, P. D., ... Demaria, M. (2019). Cellular Senescence: Defining a Path Forward. *Cell*, 179(4), 813-827. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.10.005>
- Grant, T. J., Hua, K., & Singh, A. (2016). Molecular Pathogenesis of Pancreatic Cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 144, 241-275. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2016.09.008>
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(22), 12445-12450. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12445>
- Groot, V. P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J. L., Fishman, E. K., Hruban, R. H., Weiss, M. J., Zheng, L., Wolfgang, C. L., & He, J. (2018). Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Annals of Surgery*, 267(5), 936-945. <https://doi.org/10.1097/SLA.0000000000002234>
- Guo, J. Y., & White, E. (2016). Autophagy, Metabolism, and Cancer. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 81, 73-78. <https://doi.org/10.1101/sqb.2016.81.030981>
- Guo, J., Zhang, J. F., Wang, W. M., Cheung, F. W., Lu, Y., Ng, C., Kung, H., & Liu, W. (2014). MicroRNA-218 inhibits melanogenesis by directly suppressing microphthalmia-associated transcription factor expression. *RNA Biology*, 11(6), 732-741. <https://doi.org/10.4161/rna.28865>
- Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 424. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6>

- Gupta, R., Janostiak, R., & Wajapeyee, N. (2020). Transcriptional regulators and alterations that drive melanoma initiation and progression. *Oncogene*, 39(48), 7093-7105. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01490-x>
- Hafliðadóttir, B. S., Bergsteinsdóttir, K., Praetorius, C., & Steingrímsson, E. (2010). miR-148 Regulates Mitf in Melanoma Cells. *PLoS ONE*, 5(7), e11574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011574>
- Halbrook, C. J., Lyssiotis, C. A., Pasca di Magliano, M., & Maitra, A. (2023). Pancreatic cancer: Advances and challenges. *Cell*, 186(8), 1729-1754. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.02.014>
- Han, S., Ren, Y., He, W., Liu, H., Zhi, Z., Zhu, X., Yang, T., Rong, Y., Ma, B., Purwin, T. J., Ouyang, Z., Li, C., Wang, X., Wang, X., Yang, H., Zheng, Y., Aplin, A. E., Liu, J., & Shao, Y. (2018). Publisher Correction: ERK-mediated phosphorylation regulates SOX10 sumoylation and targets expression in mutant BRAF melanoma. *Nature Communications*, 9(1), 1404. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03710-1>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hauseman, Z. J., Fodor, M., Dhembí, A., Viscomi, J., Egli, D., Bleu, M., Katz, S., Park, E., Jang, D. M., Porter, K. A., Meili, F., Guo, H., Kerr, G., Mollé, S., Velez-Vega, C., Beyer, K. S., Galli, G. G., Maira, S.-M., Stams, T., ... King, D. A. (2022). Structure of the MRAS-SHOC2-PP1C phosphatase complex. *Nature*, 609(7926), 416-423. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05086-1>
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. Biokhimiia*, 62(11), 1180-1190.
- Helmink, B. A., Khan, M. A. W., Hermann, A., Gopalakrishnan, V., & Wargo, J. A. (2019). The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, 25(3), 377-388. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0377-7>
- Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., & Fisher, D. E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature*, 391(6664), 298-301. <https://doi.org/10.1038/34681>
- Hemesath, T. J., Steingrímsson, E., McGill, G., Hansen, M. J., Vaught, J., Hodgkinson, C. A., Arnheiter, H., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Fisher, D. E. (1994). Microphthalmia, a critical

- factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes & Development*, 8(22), 2770-2780. <https://doi.org/10.1101/gad.8.22.2770>
- Hezel, A. F., & Bardeesy, N. (2008). LKB1; linking cell structure and tumor suppression. *Oncogene*, 27(55), 6908-6919. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.342>
- Hida, T., Kamiya, T., Kawakami, A., Ogino, J., Sohma, H., Uhara, H., & Jimbow, K. (2020). Elucidation of Melanogenesis Cascade for Identifying Pathophysiology and Therapeutic Approach of Pigmentary Disorders and Melanoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 6129. <https://doi.org/10.3390/ijms21176129>
- Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrímsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., & Arnheiter, H. (1993). Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*, 74(2), 395-404. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90429-t](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90429-t)
- Hodi, F. S., Corless, C. L., Giobbie-Hurder, A., Fletcher, J. A., Zhu, M., Marino-Enriquez, A., Friedlander, P., Gonzalez, R., Weber, J. S., Gajewski, T. F., O'Day, S. J., Kim, K. B., Lawrence, D., Flaherty, K. T., Luke, J. J., Collichio, F. A., Ernstoff, M. S., Heinrich, M. C., Beadling, C., ... Fisher, D. E. (2013). Imatinib for melanomas harboring mutationally activated or amplified KIT arising on mucosal, acral, and chronically sun-damaged skin. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(26), 3182-3190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7836>
- Hoeijmakers, J. H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411(6835), 366-374. <https://doi.org/10.1038/35077232>
- Hoek, K. S., & Goding, C. R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(6), 746-759. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>
- Hoffman, E. A., Frey, B. L., Smith, L. M., & Auble, D. T. (2015). Formaldehyde crosslinking: A tool for the study of chromatin complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(44), 26404-26411. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.651679>
- Huber, V., Camisaschi, C., Berzi, A., Ferro, S., Lugini, L., Triulzi, T., Tuccitto, A., Tagliabue, E., Castelli, C., & Rivoltini, L. (2017). Cancer acidity: An ultimate frontier of tumor immune escape and a novel target of immunomodulation. *Seminars in Cancer Biology*, 43, 74-89. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2017.03.001>
- Hughes, A. E., Newton, V. E., Liu, X. Z., & Read, A. P. (1994). A gene for Waardenburg syndrome type 2 maps close to the human homologue of the microphthalmia gene at chromosome 3p12-p14.1. *Nature Genetics*, 7(4), 509-512. <https://doi.org/10.1038/ng0894-509>
- Ince, F. A., Shariev, A., & Dixon, K. (2022). PTEN as a target in melanoma. *Journal of Clinical Pathology*, [jclinpath-2021-208008](https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-208008). <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2021-208008>

- Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., Barrette, T. R., Prensner, J. R., Evans, J. R., Zhao, S., Poliakov, A., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Wu, Y.-M., Robinson, D. R., Beer, D. G., Feng, F. Y., Iyer, H. K., & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, *47*(3), 199-208. <https://doi.org/10.1038/ng.3192>
- Jackson, H. J., Rafiq, S., & Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *13*(6), 370-383. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.36>
- Jackson, S. P., & Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, *461*(7267), 1071-1078. <https://doi.org/10.1038/nature08467>
- Jafari Nivlouei, S., Soltani, M., Carvalho, J., Travasso, R., Salimpour, M. R., & Shirani, E. (2021). Multiscale modeling of tumor growth and angiogenesis: Evaluation of tumor-targeted therapy. *PLoS Computational Biology*, *17*(6), e1009081. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009081>
- Jassim, A., Rahrmann, E. P., Simons, B. D., & Gilbertson, R. J. (2023). Cancers make their own luck: Theories of cancer origins. *Nature Reviews. Cancer*. <https://doi.org/10.1038/s41568-023-00602-5>
- Javelaud, D., Alexaki, V. I., Pierrat, M. J., Hoek, K. S., Dennler, S., Van Kempen, L., Bertolotto, C., Ballotti, R., Saule, S., Delmas, V., & Mauviel, A. (2011). GLI2 and M-MITF transcription factors control exclusive gene expression programs and inversely regulate invasion in human melanoma cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *24*(5), 932-943. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00893.x>
- Jiang, S., Fagman, J. B., Ma, Y., Liu, J., Vihav, C., Engstrom, C., Liu, B., & Chen, C. (2022). A comprehensive review of pancreatic cancer and its therapeutic challenges. *Aging*, *14*(18), 7635-7649. <https://doi.org/10.18632/aging.204310>
- Jiang, Y., Chen, M., Nie, H., & Yuan, Y. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: Clinical implications and future considerations. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, *15*(5), 1111-1122. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>
- Jones, A. B., Rocco, A., Lamb, L. S., Friedman, G. K., & Hjelmeland, A. B. (2022). Regulation of NKG2D Stress Ligands and Its Relevance in Cancer Progression. *Cancers*, *14*(9), 2339. <https://doi.org/10.3390/cancers14092339>
- Jones, G. (2018). *The SHOC2 phosphatase complex as a therapeutic target for ERK pathway inhibition in RAS-driven tumors*. [Tesis de Doctorado, University College London]. <https://discovery.ucl.ac.uk/id/eprint/10060157/>
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell*, *128*(4), 683-692. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.029>

- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Kamiyama, H., Jimeno, A., Hong, S.-M., Fu, B., Lin, M. T., Calhoun, E. S., Kamiyama, M., Walter, K., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Hartigan, J., ... Kinzler, K. W. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, N.Y.)*, *321*(5897), 1801-1806. <https://doi.org/10.1126/science.1164368>
- Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., Strong, R. K., Groh, V., & Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*, *447*(7143), 482-486. <https://doi.org/10.1038/nature05768>
- Katada, S., Imhof, A., & Sassone-Corsi, P. (2012). Connecting threads: Epigenetics and metabolism. *Cell*, *148*(1-2), 24-28. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.001>
- Kaufman, C. K., Mosimann, C., Fan, Z. P., Yang, S., Thomas, A. J., Ablain, J., Tan, J. L., Fogley, R. D., van Rooijen, E., Hagedorn, E. J., Ciarlo, C., White, R. M., Matos, D. A., Puller, A.-C., Santoriello, C., Liao, E. C., Young, R. A., & Zon, L. I. (2016). A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science (New York, N.Y.)*, *351*(6272), aad2197. <https://doi.org/10.1126/science.aad2197>
- Kaufman, H. L., Kohlhapp, F. J., & Zloza, A. (2015). Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *14*(9), 642-662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>
- Kawakami, A., & Fisher, D. E. (2017). The master role of microphthalmia-associated transcription factor in melanocyte and melanoma biology. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, *97*(6), 649-656. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2017.9>
- Kawata, M., Koinuma, D., Ogami, T., Umezawa, K., Iwata, C., Watabe, T., & Miyazono, K. (2012). TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition of A549 lung adenocarcinoma cells is enhanced by pro-inflammatory cytokines derived from RAW 264.7 macrophage cells. *Journal of Biochemistry*, *151*(2), 205-216. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr136>
- Kersemans, V., Cornelissen, B., Allen, P. D., Beech, J. S., & Smart, S. C. (2013). Subcutaneous tumor volume measurement in the awake, manually restrained mouse using MRI. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI*, *37*(6), 1499-1504. <https://doi.org/10.1002/jmri.23829>
- Khoo, K. H., Verma, C. S., & Lane, D. P. (2014). Drugging the p53 pathway: Understanding the route to clinical efficacy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *13*(3), 217-236. <https://doi.org/10.1038/nrd4236>
- Kida, H., Ihara, S., & Kumanogoh, A. (2013). Involvement of STAT3 in immune evasion during lung tumorigenesis. *Oncoimmunology*, *2*(1), e22653. <https://doi.org/10.4161/onci.22653>
- Kim, J., & Bae, J.-S. (2016). Tumor-Associated Macrophages and Neutrophils in Tumor Microenvironment. *Mediators of Inflammation*, *2016*, 6058147. <https://doi.org/10.1155/2016/6058147>

- Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., & Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, *362*(6423), 841-844. <https://doi.org/10.1038/362841a0>
- Kim, M. P., Li, X., Deng, J., Zhang, Y., Dai, B., Allton, K. L., Hughes, T. G., Siangco, C., Augustine, J. J., Kang, Y., McDaniel, J. M., Xiong, S., Koay, E. J., McAllister, F., Bristow, C. A., Heffernan, T. P., Maitra, A., Liu, B., Barton, M. C., ... Lozano, G. (2021). Oncogenic KRAS Recruits an Expansive Transcriptional Network through Mutant p53 to Drive Pancreatic Cancer Metastasis. *Cancer Discovery*, *11*(8), 2094-2111. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1228>
- Kim, N., Cheng, J., Jung, I., Liang, J. D., Shih, Y. L., Huang, W.-Y., Kimura, T., Lee, V. H. F., Zeng, Z. C., Zhenggan, R., Kay, C. S., Heo, S. J., Won, J. Y., & Seong, J. (2020). Stereotactic body radiation therapy vs. Radiofrequency ablation in Asian patients with hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*, *73*(1), 121-129. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.03.005>
- Kimmelman, A. C. (2015). Metabolic Dependencies in RAS-Driven Cancers. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(8), 1828-1834. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2425>
- Kindler, H. L., Wroblewski, K., Wallace, J. A., Hall, M. J., Locker, G., Nattam, S., Agamah, E., Stadler, W. M., & Vokes, E. E. (2012). Gemcitabine plus sorafenib in patients with advanced pancreatic cancer: A phase II trial of the University of Chicago Phase II Consortium. *Investigational new drugs*, *30*(1), 382-386. <https://doi.org/10.1007/s10637-010-9526-z>
- Kinsey, C. G., Camolotto, S. A., Boespflug, A. M., Guillen, K. P., Foth, M., Truong, A., Schuman, S. S., Shea, J. E., Seipp, M. T., Yap, J. T., Burrell, L. D., Lum, D. H., Whisenant, J. R., Gilcrease, G. W., Cavalieri, C. C., Rehbein, K. M., Cutler, S. L., Affolter, K. E., Welm, A. L., ... McMahon, M. (2019). Protective autophagy elicited by RAF→MEK→ERK inhibition suggests a treatment strategy for RAS-driven cancers. *Nature Medicine*, *25*(4), 620-627. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0367-9>
- Kiuru, M., & Busam, K. J. (2017). The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, *97*(2), 146-157. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.142>
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C. D., Biankin, A. V., Neale, R. E., Tempero, M., Tuveson, D. A., Hruban, R. H., & Neoptolemos, J. P. (2016). Pancreatic cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, *2*, 16022. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.22>
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: Statistical study of retinoblastoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(4), 820-823. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.4.820>

- Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., Smyth, M. J., & Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, *450*(7171), 903-907. <https://doi.org/10.1038/nature06309>
- Köhler, C., Nittner, D., Rambow, F., Radaelli, E., Stanchi, F., Vandamme, N., Baggiolini, A., Sommer, L., Berx, G., van den Oord, J. J., Gerhardt, H., Blanpain, C., & Marine, J.-C. (2017). Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAf Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes. *Cell Stem Cell*, *21*(5), 679-693.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.003>
- Kong, Y., Si, L., Li, Y., Wu, X., Xu, X., Dai, J., Tang, H., Ma, M., Chi, Z., Sheng, X., Cui, C., & Guo, J. (2016). Analysis of mTOR Gene Aberrations in Melanoma Patients and Evaluation of Their Sensitivity to PI3K-AKT-mTOR Pathway Inhibitors. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *22*(4), 1018-1027. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1110>
- Kopp, F., & Mendell, J. T. (2018). Functional Classification and Experimental Dissection of Long Noncoding RNAs. *Cell*, *172*(3), 393-407. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.011>
- Kovacs, D., Migliano, E., Muscardin, L., Silipo, V., Catricalà, C., Picardo, M., & Bellei, B. (2016). The role of WNT/ β -catenin signaling pathway in melanoma epithelial-to-mesenchymal-like switching: Evidences from patients-derived cell lines. *Oncotarget*, *7*(28), 43295-43314. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9232>
- Krah, N. M., De La O, J. P., Swift, G. H., Hoang, C. Q., Willet, S. G., Chen Pan, F., Cash, G. M., Bronner, M. P., Wright, C. V., MacDonald, R. J., & Murtaugh, L. C. (2015). The acinar differentiation determinant PTF1A inhibits initiation of pancreatic ductal adenocarcinoma. *eLife*, *4*, e07125. <https://doi.org/10.7554/eLife.07125>
- Lakshmi Narendra, B., Eshvendar Reddy, K., Shantikumar, S., & Ramakrishna, S. (2013). Immune system: A double-edged sword in cancer. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, *62*(9), 823-834. <https://doi.org/10.1007/s00011-013-0645-9>
- Lambrecht, B. N., Vanderkerken, M., & Hammad, H. (2018). The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nature Reviews. Immunology*, *18*(12), 745-758. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5>
- Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(3), 178-196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>
- Lan, F., & Shi, Y. (2009). Epigenetic regulation: Methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C: Life Sciences*, *52*(4), 311-322. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0054-z>

- Lansdorp, P. M. (2022). Telomeres, Telomerase and Cancer. *Archives of Medical Research*, 53(8), 741-746. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2022.10.004>
- Larkin, J., Ascierto, P. A., Dréno, B., Atkinson, V., Liskay, G., Maio, M., Mandalà, M., Demidov, L., Stroyakovskiy, D., Thomas, L., de la Cruz-Merino, L., Dutriaux, C., Garbe, C., Sovak, M. A., Chang, I., Choong, N., Hack, S. P., McArthur, G. A., & Ribas, A. (2014). Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 371(20), 1867-1876. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>
- Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R., Greenfield, E. A., Bourque, K., Boussiotis, V. A., Carter, L. L., Carreno, B. M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., ... Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, 2(3), 261-268. <https://doi.org/10.1038/85330>
- Lavoie, H., & Therrien, M. (2015). Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(5), 281-298. <https://doi.org/10.1038/nrm3979>
- Leão, R., Apolónio, J. D., Lee, D., Figueiredo, A., Tabori, U., & Castelo-Branco, P. (2018). Mechanisms of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) regulation: Clinical impacts in cancer. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0422-8>
- Lee, E. Y. H. P., & Muller, W. J. (2010). Oncogenes and tumor suppressor genes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(10), a003236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>
- Lee, S. B., Schramme, A., Doberstein, K., Dummer, R., Abdel-Bakky, M. S., Keller, S., Altevogt, P., Oh, S. T., Reichrath, J., Oxmann, D., Pfeilschifter, J., Mihic-Probst, D., & Gutwein, P. (2010). ADAM10 is upregulated in melanoma metastasis compared with primary melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 130(3), 763-773. <https://doi.org/10.1038/jid.2009.335>
- Lee, S., & Schmitt, C. A. (2019). The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology*, 21(1), 94-101. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0249-2>
- Leiter, U., Eigentler, T., & Garbe, C. (2014). Epidemiology of skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 810, 120-140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0437-2_7
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., Rogiers, A., Hermans, E., Baatsen, P., Aerts, S., Amant, F., Van Aelst, S., van den Oord, J., de Strooper, B., Davidson, I., ... Marine, J.-C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*, 531(7595), 518-522. <https://doi.org/10.1038/nature17161>

- Levy, C., Khaled, M., Robinson, K. C., Veguilla, R. A., Chen, P.-H., Yokoyama, S., Makino, E., Lu, J., Larue, L., Beermann, F., Chin, L., Bosenberg, M., Song, J. S., & Fisher, D. E. (2010). Lineage-specific transcriptional regulation of DICER by MITF in melanocytes. *Cell*, *141*(6), 994-1005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.05.004>
- Lewis, D. I. (2019). Animal experimentation: Implementation and application of the 3Rs. *Emerging Topics in Life Sciences*, *3*(6), 675-679. <https://doi.org/10.1042/ETLS20190061>
- Li, P., Morris, D. L., Willcox, B. E., Steinle, A., Spies, T., & Strong, R. K. (2001). Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nature Immunology*, *2*(5), 443-451. <https://doi.org/10.1038/87757>
- Liberti, M. V., & Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*, *41*(3), 211-218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
- Liu, G., Atteridge, C. L., Wang, X., Lundgren, A. D., & Wu, J. D. (2010). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(7), 3346-3350. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903789>
- Liu, J., Xiao, Q., Xiao, J., Niu, C., Li, Y., Zhang, X., Zhou, Z., Shu, G., & Yin, G. (2022). Wnt/ β -catenin signalling: Function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *7*, 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>
- Liu, J., Zhang, C., Wang, J., Hu, W., & Feng, Z. (2020). The Regulation of Ferroptosis by Tumor Suppressor p53 and its Pathway. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(21), 8387. <https://doi.org/10.3390/ijms21218387>
- Livingstone, E., Zimmer, L., Vaubel, J., & Schadendorf, D. (2014). BRAF, MEK and KIT inhibitors for melanoma: Adverse events and their management. *Chinese Clinical Oncology*, *3*(3), 29. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3865.2014.03.03>
- Loercher, A. E., Tank, E. M. H., Delston, R. B., & Harbour, J. W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *The Journal of Cell Biology*, *168*(1), 35-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200410115>
- Lokhandwala, P. M., Tseng, L.-H., Rodriguez, E., Zheng, G., Pallavajjala, A., Gocke, C. D., Eshleman, J. R., & Lin, M.-T. (2019). Clinical mutational profiling and categorization of BRAF mutations in melanomas using next generation sequencing. *BMC Cancer*, *19*(1), 665. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5864-1>
- Loras, A., Gil-Barrachina, M., Marqués-Torrejón, M. Á., Perez-Pastor, G., & Martínez-Cadenas, C. (2022). UV-Induced Somatic Mutations Driving Clonal Evolution in Healthy Skin, Nevus, and Cutaneous Melanoma. *Life (Basel, Switzerland)*, *12*(9), 1339. <https://doi.org/10.3390/life12091339>

- Lu, Z., Zou, J., Li, S., Topper, M. J., Tao, Y., Zhang, H., Jiao, X., Xie, W., Kong, X., Vaz, M., Li, H., Cai, Y., Xia, L., Huang, P., Rodgers, K., Lee, B., Riemer, J. B., Day, C.-P., Yen, R.-W. C., ... Brock, M. V. (2020). Epigenetic therapy inhibits metastases by disrupting premetastatic niches. *Nature*, *579*(7798), 284-290. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2054-x>
- Luchini, C., Grillo, F., Fassan, M., Vanoli, A., Capelli, P., Paolino, G., Ingravallo, G., Renzulli, G., Doglioni, C., D'Amuri, A., Mattiolo, P., Pecori, S., Parente, P., Florena, A. M., Zamboni, G., & Scarpa, A. (2020). Malignant epithelial/exocrine tumors of the pancreas. *Pathologica*, *112*(3), 210-226. <https://doi.org/10.32074/1591-951X-167>
- Luo, C., Merz, P. R., Chen, Y., Dickes, E., Pscherer, A., Schadendorf, D., & Eichmüller, S. B. (2013). MiR-101 inhibits melanoma cell invasion and proliferation by targeting MITF and EZH2. *Cancer Letters*, *341*(2), 240-247. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.08.021>
- Luo, D., Li, X., Tang, S., Song, F., Li, W., Xie, G., Liang, J., & Zhou, J. (2021). Epigenetic modifications in neuropathic pain. *Molecular Pain*, *17*, 17448069211056767. <https://doi.org/10.1177/17448069211056767>
- Lutzky, J., Sullivan, R. J., Cohen, J. V., Ren, Y., Li, A., & Haq, R. (2023). Phase 1b study of intravenous coxsackievirus A21 (V937) and ipilimumab for patients with metastatic uveal melanoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *149*(9), 6059-6066. <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04510-3>
- Lyon, P., Strippoli, V., Fang, B., & Cimmino, L. (2020). B Vitamins and One-Carbon Metabolism: Implications in Human Health and Disease. *Nutrients*, *12*(9), 2867. <https://doi.org/10.3390/nu12092867>
- Maitra, A., Adsay, N. V., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., De Marzo, A., Cameron, J. L., Yeo, C. J., & Hruban, R. H. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *16*(9), 902-912. <https://doi.org/10.1097/01.MP.0000086072.56290.FB>
- Maitra, A., & Hruban, R. H. (2008). Pancreatic cancer. *Annual Review of Pathology*, *3*, 157-188. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154305>
- Mallarino, R., Henegar, C., Mirasierra, M., Manceau, M., Schradin, C., Vallejo, M., Beronja, S., Barsh, G. S., & Hoekstra, H. E. (2016). Developmental mechanisms of stripe patterns in rodents. *Nature*, *539*(7630), 518-523. <https://doi.org/10.1038/nature20109>
- Mansky, K. C., Sankar, U., Han, J., & Ostrowski, M. C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF-kappa B ligand signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(13), 11077-11083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111696200>

- Marino, M. L., Carrera, C., Marchetti, M. A., & Marghoob, A. A. (2016). Practice Gaps in Dermatology: Melanocytic Lesions and Melanoma. *Dermatologic Clinics*, *34*(3), 353-362. <https://doi.org/10.1016/j.det.2016.03.003>
- Marusyk, A., Janiszewska, M., & Polyak, K. (2020). Intratumor heterogeneity: The Rosetta stone of therapy resistance. *Cancer cell*, *37*(4), 471-484. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.007>
- Masoud, G. N., & Li, W. (2015). HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *5*(5), 378-389. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>
- Mathew, R., Khor, S., Hackett, S. R., Rabinowitz, J. D., Perlman, D. H., & White, E. (2014). Functional role of autophagy-mediated proteome remodeling in cell survival signaling and innate immunity. *Molecular Cell*, *55*(6), 916-930. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.07.019>
- McGill, G. G., Horstmann, M., Widlund, H. R., Du, J., Motyckova, G., Nishimura, E. K., Lin, Y.-L., Ramaswamy, S., Avery, W., Ding, H.-F., Jordan, S. A., Jackson, I. J., Korsmeyer, S. J., Golub, T. R., & Fisher, D. E. (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell*, *109*(6), 707-718. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00762-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00762-6)
- McGuigan, A., Kelly, P., Turkington, R. C., Jones, C., Coleman, H. G., & McCain, R. S. (2018). Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World Journal of Gastroenterology*, *24*(43), 4846-4861. <https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i43.4846>
- Merhavi-Shoham, E., Itzhaki, O., Markel, G., Schachter, J., & Besser, M. J. (2017). Adoptive Cell Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)*, *23*(1), 48-53. <https://doi.org/10.1097/PPO.0000000000000240>
- Midha, S., Chawla, S., & Garg, P. K. (2016). Modifiable and non-modifiable risk factors for pancreatic cancer: A review. *Cancer Letters*, *381*(1), 269-277. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.07.022>
- Miller, A. J., Levy, C., Davis, I. J., Razin, E., & Fisher, D. E. (2005). Sumoylation of MITF and its related family members TFE3 and TFEB. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(1), 146-155. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411757200>
- Mitchell, D., Chintala, S., & Dey, M. (2018). Plasmacytoid dendritic cell in immunity and cancer. *Journal of Neuroimmunology*, *322*, 63-73. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.06.012>
- Mitra, D., Luo, X., Morgan, A., Wang, J., Hoang, M. P., Lo, J., Guerrero, C. R., Lennerz, J. K., Mihm, M. C., Wargo, J. A., Robinson, K. C., Devi, S. P., Vanover, J. C., D'Orazio, J. A., McMahon, M., Bosenberg, M. W., Haigis, K. M., Haber, D. A., Wang, Y., & Fisher, D. E. (2012). An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*, *491*(7424), 449-453. <https://doi.org/10.1038/nature11624>

- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Molecular Biology of the Cell*, *15*(3), 1101-1111. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-09-0704>
- Mohania, D., Chandel, S., Kumar, P., Verma, V., Digvijay, K., Tripathi, D., Choudhury, K., Mitten, S. K., & Shah, D. (2017). Ultraviolet Radiations: Skin Defense-Damage Mechanism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *996*, 71-87. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56017-5_7
- Möller, K., Sigurbjörnsdóttir, S., Arnthorsson, A. O., Pogenberg, V., Dilshat, R., Fock, V., Brynjólfssdóttir, S. H., Bindesboll, C., Bessadóttir, M., Ogmundsdóttir, H. M., Simonsen, A., Larue, L., Wilmanns, M., Thorsson, V., Steingrímsson, E., & Ogmundsdóttir, M. H. (2019). MITF has a central role in regulating starvation-induced autophagy in melanoma. *Scientific Reports*, *9*(1), 1055. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37522-6>
- Montenegro, M. F., Collado-González, M. D. M., Fernández-Pérez, M. P., Hammouda, M. B., Tolordava, L., Gamkrelidze, M., & Rodríguez-López, J. N. (2014). Promoting E2F1-mediated apoptosis in oestrogen receptor- α -negative breast cancer cells. *BMC Cancer*, *14*, 539. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-539>
- Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2020). PRMT1-dependent methylation of BRCA1 contributes to the epigenetic defense of breast cancer cells against ionizing radiation. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70289-3>
- Montenegro, M. F., González-Guerrero, R., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2016a). Targeting the epigenetics of the DNA damage response in breast cancer. *Cell Death & Disease*, *7*, e2180. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.85>
- Montenegro, M. F., Sáez-Ayala, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2012). Reactivation of the tumour suppressor RASSF1A in breast cancer by simultaneous targeting of DNA and E2F1 methylation. *PloS One*, *7*(12), e52231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052231>
- Montenegro, M. F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M. P., Sáez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2015). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. *Oncogene*, *34*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.605>
- Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., González-Guerrero, R., Martínez-Barba, E., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2016b). Tumor suppressor SET9 guides the epigenetic plasticity of breast cancer cells and serves as an early-stage biomarker for predicting metastasis. *Oncogene*, *35*(47), 6143-6152. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.154>

- Montes, M., Nielsen, M. M., Maglieri, G., Jacobsen, A., Højfeldt, J., Agrawal-Singh, S., Hansen, K., Helin, K., van de Werken, H. J. G., Pedersen, J. S., & Lund, A. H. (2015). The lncRNA MIR31HG regulates p16(INK4A) expression to modulate senescence. *Nature Communications*, 6, 6967. <https://doi.org/10.1038/ncomms7967>
- Morris, E. J., Jha, S., Restaino, C. R., Dayananth, P., Zhu, H., Cooper, A., Carr, D., Deng, Y., Jin, W., Black, S., Long, B., Liu, J., Dinunzio, E., Windsor, W., Zhang, R., Zhao, S., Angagaw, M. H., Pinheiro, E. M., Desai, J., ... Samatar, A. A. (2013). Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors. *Cancer Discovery*, 3(7), 742-750. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0070>
- Mpilla, G. B., Philip, P. A., El-Rayes, B., & Azmi, A. S. (2020). Pancreatic neuroendocrine tumors: Therapeutic challenges and research limitations. *World Journal of Gastroenterology*, 26(28), 4036-4054. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i28.4036>
- Muenst, S., Läubli, H., Soysal, S. D., Zippelius, A., Tzankov, A., & Hoeller, S. (2016). The immune system and cancer evasion strategies: Therapeutic concepts. *Journal of Internal Medicine*, 279(6), 541-562. <https://doi.org/10.1111/joim.12470>
- Müller, J., Krijgsman, O., Tsoi, J., Robert, L., Hugo, W., Song, C., Kong, X., Possik, P. A., Cornelissen-Steijger, P. D. M., Geukes Foppen, M. H., Kemper, K., Goding, C. R., McDermott, U., Blank, C., Haanen, J., Graeber, T. G., Ribas, A., Lo, R. S., & Peeper, D. S. (2014). Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nature Communications*, 5, 5712. <https://doi.org/10.1038/ncomms6712>
- Murtas, D., Piras, F., Minerba, L., Maxia, C., Ferreli, C., Demurtas, P., Lai, S., Mura, E., Corrias, M., Sirigu, P., & Perra, M. T. (2015). Activated Notch1 expression is associated with angiogenesis in cutaneous melanoma. *Clinical and Experimental Medicine*, 15(3), 351-360. <https://doi.org/10.1007/s10238-014-0300-y>
- Musial, C., Kuban-Jankowska, A., & Gorska-Ponikowska, M. (2020). Beneficial Properties of Green Tea Catechins. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5), 1744. <https://doi.org/10.3390/ijms21051744>
- Nakayama, A., Nguyen, M. T., Chen, C. C., Opdecamp, K., Hodgkinson, C. A., & Arnheiter, H. (1998). Mutations in microphthalmia, the mouse homolog of the human deafness gene MITF, affect neuroepithelial and neural crest-derived melanocytes differently. *Mechanisms of Development*, 70(1-2), 155-166. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(97\)00188-3](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(97)00188-3)
- Nasti, T. H., & Timares, L. (2015). Invited Review MC1R, Eumelanin and Pheomelanin: Their role in determining the susceptibility to skin cancer. *Photochemistry and photobiology*, 91(1), 188-200. <https://doi.org/10.1111/php.12335>
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Campo, L. S. D., & Rodríguez-López, J. N. (2007). Effects of folate cycle disruption by the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate. The

- International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 39(12), 2215-2225. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.005>
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., García-Cánovas, F., Durrant, M. C., Thorneley, R. N. F., & Rodríguez-López, J. N. (2005a). The antifolate activity of tea catechins. *Cancer Research*, 65(6), 2059-2064. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3469>
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Hiner, A. N. P., Sadunishvili, T., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2005b). Kinetics of the inhibition of bovine liver dihydrofolate reductase by tea catechins: Origin of slow-binding inhibition and pH studies. *Biochemistry*, 44(20), 7512-7525. <https://doi.org/10.1021/bi050160t>
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Sánchez-Del-Campo, L., García-Cánovas, F., & Rodríguez-López, J. N. (2008). The anti-inflammatory and anti-cancer properties of epigallocatechin-3-gallate are mediated by folate cycle disruption, adenosine release and NF-kappaB suppression. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 57(10), 472-478. <https://doi.org/10.1007/s00011-008-8013-x>
- Negrini, S., Gorgoulis, V. G., & Halazonetis, T. D. (2010). Genomic instability—An evolving hallmark of cancer. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 11(3), 220-228. <https://doi.org/10.1038/nrm2858>
- Nejman, D., Livyatan, I., Fuks, G., Gavert, N., Zwang, Y., Geller, L. T., Rotter-Maskowitz, A., Weiser, R., Mallel, G., Gigi, E., Meltser, A., Douglas, G. M., Kamer, I., Gopalakrishnan, V., Dadosh, T., Levin-Zaidman, S., Avnet, S., Atlan, T., Cooper, Z. A., ... Straussman, R. (2020). The human tumor microbiome is composed of tumor type-specific intracellular bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6494), 973-980. <https://doi.org/10.1126/science.aay9189>
- Neoptolemos, J. P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., & Palmer, D. H. (2018). Therapeutic developments in pancreatic cancer: Current and future perspectives. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 15(6), 333-348. <https://doi.org/10.1038/s41575-018-0005-x>
- Neoptolemos, J. P., Palmer, D. H., Ghaneh, P., Psarelli, E. E., Valle, J. W., Halloran, C. M., Faluyi, O., O'Reilly, D. A., Cunningham, D., Wadsley, J., Darby, S., Meyer, T., Gillmore, R., Anthony, A., Lind, P., Glimelius, B., Falk, S., Izbicki, J. R., Middleton, G. W., ... European Study Group for Pancreatic Cancer. (2017). Comparison of adjuvant gemcitabine and capecitabine with gemcitabine monotherapy in patients with resected pancreatic cancer (ESPAC-4): A multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 389(10073), 1011-1024. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32409-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32409-6)
- Ng, M. F., Simmons, J. L., & Boyle, G. M. (2022). Heterogeneity in Melanoma. *Cancers*, 14(12), 3030. <https://doi.org/10.3390/cancers14123030>

- Nicholson, K. M., & Anderson, N. G. (2002). The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cellular Signalling*, *14*(5), 381-395. [https://doi.org/10.1016/s0898-6568\(01\)00271-6](https://doi.org/10.1016/s0898-6568(01)00271-6)
- Nishimura, E. K., Suzuki, M., Igras, V., Du, J., Lonning, S., Miyachi, Y., Roes, J., Beermann, F., & Fisher, D. E. (2010). Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance. *Cell Stem Cell*, *6*(2), 130-140. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.12.010>
- Nsengimana, J., Laye, J., Folia, A., O'Shea, S., Muralidhar, S., Poźniak, J., Droop, A., Chan, M., Walker, C., Parkinson, L., Gascoyne, J., Mell, T., Polso, M., Jewell, R., Randerson-Moor, J., Cook, G. P., Bishop, D. T., & Newton-Bishop, J. (2018). β -Catenin-mediated immune evasion pathway frequently operates in primary cutaneous melanomas. *The Journal of Clinical Investigation*, *128*(5), 2048-2063. <https://doi.org/10.1172/JCI95351>
- Odenthal, J., Takes, R., & Friedl, P. (2016). Plasticity of tumor cell invasion: Governance by growth factors and cytokines. *Carcinogenesis*, *37*(12), 1117-1128. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgw098>
- Oh, M. H., Sun, I. H., Zhao, L., Leone, R. D., Sun, I. M., Xu, W., Collins, S. L., Tam, A. J., Blosser, R. L., Patel, C. H., Englert, J. M., Arwood, M. L., Wen, J., Chan-Li, Y., Tenora, L., Majer, P., Rais, R., Slusher, B. S., Horton, M. R., & Powell, J. D. (2020). Targeting glutamine metabolism enhances tumor-specific immunity by modulating suppressive myeloid cells. *The Journal of Clinical Investigation*, *130*(7), 3865-3884. <https://doi.org/10.1172/JCI131859>
- Ohanna, M., Bonet, C., Bille, K., Allegra, M., Davidson, I., Bahadoran, P., Lacour, J. P., Ballotti, R., & Bertolotto, C. (2014). SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. *Oncotarget*, *5*(8), 2085-2095. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1791>
- O'Leary, B., Finn, R. S., & Turner, N. C. (2016). Treating cancer with selective CDK4/6 inhibitors. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, *13*(7), 417-430. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.26>
- Opdecamp, K., Nakayama, A., Nguyen, M. T., Hodgkinson, C. A., Pavan, W. J., & Arnheiter, H. (1997). Melanocyte development in vivo and in neural crest cell cultures: Crucial dependence on the Mitf basic-helix-loop-helix-zipper transcription factor. *Development (Cambridge, England)*, *124*(12), 2377-2386. <https://doi.org/10.1242/dev.124.12.2377>
- Oppezzo, A., & Rosselli, F. (2021). The underestimated role of the microphthalmia-associated transcription factor (MiTF) in normal and pathological haematopoiesis. *Cell & Bioscience*, *11*(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00529-0>
- Orth, M., Metzger, P., Gerum, S., Mayerle, J., Schneider, G., Belka, C., Schnurr, M., & Lauber, K. (2019). Pancreatic ductal adenocarcinoma: Biological hallmarks, current status, and future perspectives of combined modality treatment approaches. *Radiation Oncology (London, England)*, *14*(1), 141. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1345-6>

- Ostrowski, S. M., & Fisher, D. E. (2021). Biology of Melanoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 35(1), 29-56. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2020.08.010>
- Pai, S. G., Carneiro, B. A., Mota, J. M., Costa, R., Leite, C. A., Barroso-Sousa, R., Kaplan, J. B., Chae, Y. K., & Giles, F. J. (2017). Wnt/beta-catenin pathway: Modulating anticancer immune response. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 101. <https://doi.org/10.1186/s13045-017-0471-6>
- Palmieri, G., Ombra, M., Colombino, M., Casula, M., Sini, M., Manca, A., Paliogiannis, P., Ascierto, P. A., & Cossu, A. (2015). Multiple Molecular Pathways in Melanomagenesis: Characterization of Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, 5, 183. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00183>
- Papa, A., & Pandolfi, P. P. (2019). The PTEN-PI3K Axis in Cancer. *Biomolecules*, 9(4), 153. <https://doi.org/10.3390/biom9040153>
- Papac, R. J. (1996). Spontaneous regression of cancer. *Cancer Treatment Reviews*, 22(6), 395-423. [https://doi.org/10.1016/s0305-7372\(96\)90023-7](https://doi.org/10.1016/s0305-7372(96)90023-7)
- Parish, C. R. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunology and Cell Biology*, 81(2), 106-113. <https://doi.org/10.1046/j.0818-9641.2003.01151.x>
- Pastushenko, I., Brisebarre, A., Sifrim, A., Fioramonti, M., Revenco, T., Boumahdi, S., Van Keymeulen, A., Brown, D., Moers, V., Lemaire, S., De Clercq, S., Minguijón, E., Balsat, C., Sokolow, Y., Dubois, C., De Cock, F., Scozzaro, S., Sopena, F., Lanas, A., ... Blanpain, C. (2018). Identification of the tumour transition states occurring during EMT. *Nature*, 556(7702), 463-468. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0040-3>
- Patton, E. E., Mueller, K. L., Adams, D. J., Anandasabapathy, N., Aplin, A. E., Bertolotto, C., Bosenberg, M., Ceol, C. J., Burd, C. E., Chi, P., Herlyn, M., Holmen, S. L., Karreth, F. A., Kaufman, C. K., Khan, S., Kobold, S., Leucci, E., Levy, C., Lombard, D. B., ... Merlino, G. (2021). Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer cell*, 39(5), 610-631. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011>
- Paul, S., & Lal, G. (2017). The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 8, 1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
- Pavlova, N. N., & Thompson, C. B. (2016). THE EMERGING HALLMARKS OF CANCER METABOLISM. *Cell metabolism*, 23(1), 27-47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
- Pham, D. (Daniel) M., Guhan, S., & Tsao, H. (2020). KIT and Melanoma: Biological Insights and Clinical Implications. *Yonsei Medical Journal*, 61(7), 562-571. <https://doi.org/10.3349/ymj.2020.61.7.562>

- Pinnix, C. C., Lee, J. T., Liu, Z.-J., McDaid, R., Balint, K., Beverly, L. J., Brafford, P. A., Xiao, M., Himes, B., Zabierowski, S. E., Yashiro-Ohtani, Y., Nathanson, K. L., Bengston, A., Pollock, P. M., Weeraratna, A. T., Nickoloff, B. J., Pear, W. S., Capobianco, A. J., & Herlyn, M. (2009). Active Notch1 confers a transformed phenotype to primary human melanocytes. *Cancer Research*, 69(13), 5312-5320. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3767>
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A., & D'Orazi, G. (2016). Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging (Albany NY)*, 8(4), 603-619. <https://doi.org/10.18632/aging.100934>
- Ploper, D., Taelman, V. F., Robert, L., Perez, B. S., Titz, B., Chen, H. W., Graeber, T. G., von Ew, E., Ribas, A., & De Robertis, E. M. (2015). MITF drives endolysosomal biogenesis and potentiates Wnt signaling in melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(5), E420-E429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424576112>
- Pol, J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2016). First oncolytic virus approved for melanoma immunotherapy. *Oncoimmunology*, 5(1), e1115641. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1115641>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N. K., Trent, J. M., & Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19-20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Pon, J. R., & Marra, M. A. (2015). Driver and passenger mutations in cancer. *Annual Review of Pathology*, 10, 25-50. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012414-040312>
- Pópulo, H., Caldas, R., Lopes, J. M., Pardal, J., Máximo, V., & Soares, P. (2015). Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase supports dichloroacetate as a candidate for cutaneous melanoma therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(6), 733-745. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1045416>
- Pópulo, H., Soares, P., & Lopes, J. M. (2012). Insights into melanoma: Targeting the mTOR pathway for therapeutics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 16(7), 689-705. <https://doi.org/10.1517/14728222.2012.691472>
- Porcelli, L., Mazzotta, A., Garofoli, M., Di Fonte, R., Guida, G., Guida, M., Tommasi, S., & Azzariti, A. (2021). Active notch protects MAPK activated melanoma cell lines from MEK inhibitor cobimetinib. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 133, 111006. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111006>
- Poto, R., Troiani, T., Criscuolo, G., Marone, G., Ciardiello, F., Tocchetti, C. G., & Varricchi, G. (2022). Holistic Approach to Immune Checkpoint Inhibitor-Related Adverse Events. *Frontiers in Immunology*, 13, 804597. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.804597>

- Puram, S. V., Tirosh, I., Parikh, A. S., Patel, A. P., Yizhak, K., Gillespie, S., Rodman, C., Luo, C. L., Mroz, E. A., Emerick, K. S., Deschler, D. G., Varvares, M. A., Mylvaganam, R., Rozenblatt-Rosen, O., Rocco, J. W., Faquin, W. C., Lin, D. T., Regev, A., & Bernstein, B. E. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis of Primary and Metastatic Tumor Ecosystems in Head and Neck Cancer. *Cell*, *171*(7), 1611-1624.e24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.044>
- Pylyayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., & Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews. Cancer*, *11*(11), 761-774. <https://doi.org/10.1038/nrc3106>
- Raimondi, S., Suppa, M., & Gandini, S. (2020). Melanoma Epidemiology and Sun Exposure. *Acta Dermato-Venereologica*, *100*(11), adv00136. <https://doi.org/10.2340/00015555-3491>
- Rambow, F., Marine, J.-C., & Goding, C. R. (2019). Melanoma plasticity and phenotypic diversity: Therapeutic barriers and opportunities. *Genes & Development*, *33*(19-20), 1295-1318. <https://doi.org/10.1101/gad.329771.119>
- Randic, T., Kozar, I., Margue, C., Utikal, J., & Kreis, S. (2021). NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. *Cancer Treatment Reviews*, *99*, 102238. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238>
- Rastrelli, M., Tropea, S., Pigozzo, J., Bezzon, E., Campana, L. G., Stramare, R., Alaibac, M., & Rossi, C. R. (2014). Melanoma m1: Diagnosis and therapy. *In Vivo (Athens, Greece)*, *28*(3), 273-285.
- Rawla, P., Sunkara, T., & Gaduputi, V. (2019). Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors. *World Journal of Oncology*, *10*(1), 10-27. <https://doi.org/10.14740/wjon1166>
- Renault, T. T., & Chipuk, J. E. (2013). Getting away with murder: How do the BCL-2 family of proteins kill with immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1285*(1), 59-79. <https://doi.org/10.1111/nyas.12045>
- Ribas, A., Daud, A., Pavlick, A. C., Gonzalez, R., Lewis, K. D., Hamid, O., Gajewski, T. F., Puzanov, I., Wongchenko, M., Rooney, I., Hsu, J. J., Yan, Y., Park, E., & McArthur, G. A. (2020). Extended 5-Year Follow-up Results of a Phase Ib Study (BRIM7) of Vemurafenib and Cobimetinib in BRAF-Mutant Melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *26*(1), 46-53. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-4180>
- Ribas, A., & Wolchok, J. D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (New York, N.Y.)*, *359*(6382), 1350-1355. <https://doi.org/10.1126/science.aar4060>
- Rizos, H., Menzies, A. M., Pupo, G. M., Carlino, M. S., Fung, C., Hyman, J., Haydu, L. E., Mijatov, B., Becker, T. M., Boyd, S. C., Howle, J., Saw, R., Thompson, J. F., Kefford, R. F., Scolyer, R. A., & Long, G. V. (2014). BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma: Spectrum and clinical impact. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American*

- Association for Cancer Research*, 20(7), 1965-1977. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3122>
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J. J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M. S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C. U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., ... KEYNOTE-006 investigators. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 372(26), 2521-2532. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093>
- Rojas, L. A., Sethna, Z., Soares, K. C., Olcese, C., Pang, N., Patterson, E., Lihm, J., Ceglia, N., Guasp, P., Chu, A., Yu, R., Chandra, A. K., Waters, T., Ruan, J., Amisaki, M., Zebboudj, A., Odgerel, Z., Payne, G., Derhovanessian, E., ... Balachandran, V. P. (2023). Personalized RNA neoantigen vaccines stimulate T cells in pancreatic cancer. *Nature*, 618(7963), 144-150. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06063-y>
- Rothberg, J. M., Bailey, K. M., Wojtkowiak, J. W., Ben-Nun, Y., Bogyo, M., Weber, E., Moin, K., Blum, G., Mattingly, R. R., Gillies, R. J., & Sloane, B. F. (2013). Acid-mediated tumor proteolysis: Contribution of cysteine cathepsins. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 15(10), 1125-1137. <https://doi.org/10.1593/neo.13946>
- Roufayel, R., Younes, K., Al-Sabi, A., & Murshid, N. (2022). BH3-Only Proteins Noxa and Puma Are Key Regulators of Induced Apoptosis. *Life*, 12(2), 256. <https://doi.org/10.3390/life12020256>
- Ryan, M. B., Der, C. J., Wang-Gillam, A., & Cox, A. D. (2015). Targeting RAS-mutant cancers: Is ERK the key? *Trends in Cancer*, 1(3), 183-198. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2015.10.001>
- Sáenz, S., Conejo-Mir, J., & Cayuela, A. (2005). [Melanoma epidemiology in Spain]. *Actas Dermo-Sifiliograficas*, 96(7), 411-418. [https://doi.org/10.1016/s0001-7310\(05\)73105-7](https://doi.org/10.1016/s0001-7310(05)73105-7)
- Sáez-Ayala, M., Montenegro, M. F., Sánchez-Del-Campo, L., Fernández-Pérez, M. P., Chazarra, S., Freter, R., Middleton, M., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Goding, C. R., & Rodríguez-López, J. N. (2013). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell*, 24(1), 105-119. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.05.009>
- Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M. F., Chazarra, S., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2011). Comparison of a pair of synthetic tea-catechin-derived epimers: Synthesis, antifolate activity, and tyrosinase-mediated activation in melanoma. *ChemMedChem*, 6(3), 440-449. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201000482>
- Saghafinia, S., Homicsko, K., Di Domenico, A., Wullschleger, S., Perren, A., Marinoni, I., Ciriello, G., Michael, I. P., & Hanahan, D. (2021). Cancer Cells Retrace a Stepwise Differentiation Program during Malignant Progression. *Cancer Discovery*, 11(10), 2638-2657. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-20-1637>

- Saitoh, M. (2018). Involvement of partial EMT in cancer progression. *Journal of Biochemistry*, 164(4), 257-264. <https://doi.org/10.1093/jb/mvy047>
- Saman, H., Raza, S. S., Uddin, S., & Rasul, K. (2020). Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches. *Cancers*, 12(5), 1172. <https://doi.org/10.3390/cancers12051172>
- Sánchez-del-Campo, L., Otón, F., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., Chazarra, S., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(7), 2018-2026. <https://doi.org/10.1021/jm701346h>
- Sánchez-del-Campo, L., & Rodríguez-López, J. N. (2008). Targeting the methionine cycle for melanoma therapy with 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin. *International Journal of Cancer*, 123(10), 2446-2455. <https://doi.org/10.1002/ijc.23813>
- Sánchez-Del-Campo, L., Sáez-Ayala, M., Chazarra, S., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2009a). Binding of natural and synthetic polyphenols to human dihydrofolate reductase. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(12), 5398-5410. <https://doi.org/10.3390/ijms10125398>
- Sánchez-del-Campo, L., Tárraga, A., Montenegro, M. F., Cabezas-Herrera, J., & Rodríguez-López, J. N. (2009b). Melanoma activation of 3-o-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. *Molecular Pharmaceutics*, 6(3), 883-894. <https://doi.org/10.1021/mp800259k>
- Sautès-Fridman, C., Petitprez, F., Calderaro, J., & Fridman, W. H. (2019). Tertiary lymphoid structures in the era of cancer immunotherapy. *Nature Reviews. Cancer*, 19(6), 307-325. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0144-6>
- Scatena, C., Murtas, D., & Tomei, S. (2021). Cutaneous Melanoma Classification: The Importance of High-Throughput Genomic Technologies. *Frontiers in Oncology*, 11, 635488. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.635488>
- Schneider, G., & Schmid, R. M. (2003). Genetic alterations in pancreatic carcinoma. *Molecular Cancer*, 2, 15. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-2-15>
- Schwarz, T. (2008). 25 years of UV-induced immunosuppression mediated by T cells-from disregarded T suppressor cells to highly respected regulatory T cells. *Photochemistry and Photobiology*, 84(1), 10-18. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00223.x>
- Sears, C. L., & Garrett, W. S. (2014). Microbes, microbiota, and colon cancer. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 317-328. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.007>
- Segura, M. F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., Polsky, D., Wei, J., Lee, P., Belitskaya-Levy, I., Bhardwaj,

- N., Osman, I., & Hernando, E. (2009). Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(6), 1814-1819. <https://doi.org/10.1073/pnas.0808263106>
- Semenza, G. L. (2009). Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Seminars in Cancer Biology*, 19(1), 12-16. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.11.009>
- Sepich-Poore, G. D., Zitvogel, L., Straussman, R., Hasty, J., Wargo, J. A., & Knight, R. (2021). The microbiome and human cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 371(6536), eabc4552. <https://doi.org/10.1126/science.abc4552>
- Shah, M., Bhoumik, A., Goel, V., Dewing, A., Breitwieser, W., Kluger, H., Krajewski, S., Krajewska, M., Dehart, J., Lau, E., Kallenberg, D. M., Jeong, H., Eroshkin, A., Bennett, D. C., Chin, L., Bosenberg, M., Jones, N., & Ronai, Z. A. (2010). A role for ATF2 in regulating MITF and melanoma development. *PLoS Genetics*, 6(12), e1001258. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001258>
- Shay, J. W., & Wright, W. E. (2005). Senescence and immortalization: Role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 26(5), 867-874. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgh296>
- Sherr, C. J. (2001). The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(10), 731-737. <https://doi.org/10.1038/35096061>
- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103-112. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00102-2)
- Shulpekova, Y., Nechaev, V., Kardasheva, S., Sedova, A., Kurbatova, A., Bueverova, E., Kopylov, A., Malsagova, K., Dlamini, J. C., & Ivashkin, V. (2021). The Concept of Folic Acid in Health and Disease. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(12), 3731. <https://doi.org/10.3390/molecules26123731>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17-48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sigal, A., & Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: The demons of the guardian of the genome. *Cancer Research*, 60(24), 6788-6793.
- Somasundaram, R., Herlyn, M., & Wagner, S. N. (2016). The role of tumor microenvironment in melanoma therapy resistance. *Melanoma Management*, 3(1), 23-32. <https://doi.org/10.2217/mmt.15.37>
- Soularue, E., Lepage, P., Colombel, J. F., Coutzac, C., Faleck, D., Marthey, L., Collins, M., Chaput, N., Robert, C., & Carbonnel, F. (2018). Enterocolitis due to immune checkpoint inhibitors: A systematic review. *Gut*, 67(11), 2056-2067. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-316948>

- Specenier, P. (2016). Nivolumab in melanoma. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 16(12), 1247-1261. <https://doi.org/10.1080/14737140.2016.1249856>
- Stahl, J. M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J. Q., Bosenberg, M. W., Kester, M., Sandirasegarane, L., & Robertson, G. P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Research*, 64(19), 7002-7010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1399>
- Stephen, A. G., Esposito, D., Bagni, R. K., & McCormick, F. (2014). Dragging ras back in the ring. *Cancer Cell*, 25(3), 272-281. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.017>
- Strub, T., Giuliano, S., Ye, T., Bonet, C., Keime, C., Kobi, D., Le Gras, S., Cormont, M., Ballotti, R., Bertolotto, C., & Davidson, I. (2011). Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene*, 30(20), 2319-2332. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.612>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209-249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Svastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovicová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J., & Pastoreková, S. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letters*, 577(3), 439-445. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.10.043>
- Swietach, P., Rossini, A., Spitzer, K. W., & Vaughan-Jones, R. D. (2007). H⁺ ion activation and inactivation of the ventricular gap junction: A basis for spatial regulation of intracellular pH. *Circulation Research*, 100(7), 1045-1054. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000264071.11619.47>
- Tachibana, M. (2000). MITF: A stream flowing for pigment cells. *Pigment Cell Research*, 13(4), 230-240. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2000.130404.x>
- Tachibana, M., Perez-Jurado, L. A., Nakayama, A., Hodgkinson, C. A., Li, X., Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., & Arnheiter, H. (1994). Cloning of MITF, the human homolog of the mouse microphthalmia gene and assignment to chromosome 3p14.1-p12.3. *Human Molecular Genetics*, 3(4), 553-557. <https://doi.org/10.1093/hmg/3.4.553>
- Takeda, K., Takemoto, C., Kobayashi, I., Watanabe, A., Nobukuni, Y., Fisher, D. E., & Tachibana, M. (2000). Ser298 of MITF, a mutation site in Waardenburg syndrome type 2, is a phosphorylation site with functional significance. *Human Molecular Genetics*, 9(1), 125-132. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.1.125>

- Talmadge, J. E., Donkor, M., & Scholar, E. (2007). Inflammatory cell infiltration of tumors: Jekyll or Hyde. *Cancer Metastasis Reviews*, 26(3-4), 373-400. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9072-0>
- Tarrado-Castellarnau, M., de Atauri, P., & Cascante, M. (2016). Oncogenic regulation of tumor metabolic reprogramming. *Oncotarget*, 7(38), 62726-62753. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10911>
- Tassabehji, M., Newton, V. E., & Read, A. P. (1994). Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nature Genetics*, 8(3), 251-255. <https://doi.org/10.1038/ng1194-251>
- Tauriello, D. V. F., Sancho, E., & Batlle, E. (2022). Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 22(1), 25-44. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00413-6>
- Tempero, M. A., Pelzer, U., O'Reilly, E. M., Winter, J., Oh, D.-Y., Li, C.-P., Tortora, G., Chang, H.-M., Lopez, C. D., Bekaii-Saab, T., Ko, A. H., Santoro, A., Park, J. O., Noel, M. S., Frassinetti, G. L., Shan, Y.-S., Dean, A., Riess, H., Van Cutsem, E., ... AFACT Investigators. (2023). Adjuvant nab-Paclitaxel + Gemcitabine in Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Results From a Randomized, Open-Label, Phase III Trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 41(11), 2007-2019. <https://doi.org/10.1200/JCO.22.01134>
- Thienpont, B., Van Dyck, L., & Lambrechts, D. (2016). Tumors smother their epigenome. *Molecular & Cellular Oncology*, 3(6), e1240549. <https://doi.org/10.1080/23723556.2016.1240549>
- Thomas, A. J., & Erickson, C. A. (2009). FOXD3 regulates the lineage switch between neural crest-derived glial cells and pigment cells by repressing MITF through a non-canonical mechanism. *Development (Cambridge, England)*, 136(11), 1849-1858. <https://doi.org/10.1242/dev.031989>
- Thomas, S., Izzard, J., Walsh, E., Batich, K., Chongsathidkiet, P., Clarke, G., Sela, D. A., Muller, A. J., Mullin, J. M., Albert, K., Gilligan, J. P., DiGiulio, K., Dilbarova, R., Alexander, W., & Prendergast, G. C. (2017). The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research*, 77(8), 1783-1812. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2929>
- Topalian, S. L., Drake, C. G., & Pardoll, D. M. (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell*, 27(4), 450-461. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
- Torres, C. M., Biran, A., Burney, M. J., Patel, H., Henser-Brownhill, T., Cohen, A.-H. S., Li, Y., Ben-Hamo, R., Nye, E., Spencer-Dene, B., Chakravarty, P., Efroni, S., Matthews, N., Misteli,

- T., Meshorer, E., & Scaffidi, P. (2016). The linker histone H1.0 generates epigenetic and functional intratumor heterogeneity. *Science (New York, N.Y.)*, *353*(6307), aaf1644. <https://doi.org/10.1126/science.aaf1644>
- Toussi, A., Mans, N., Welborn, J., & Kiuru, M. (2020). Germline mutations predisposing to melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology*, *47*(7), 606-616. <https://doi.org/10.1111/cup.13689>
- Ullrich, N., Löffek, S., Horn, S., Ennen, M., Sánchez-Del-Campo, L., Zhao, F., Breitenbuecher, F., Davidson, I., Singer, B. B., Schadendorf, D., Goding, C. R., & Helfrich, I. (2015). MITF is a critical regulator of the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (CEACAM1) in malignant melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, *28*(6), 736-740. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12414>
- Umansky, V., & Sevko, A. (2012). Melanoma-induced immunosuppression and its neutralization. *Seminars in Cancer Biology*, *22*(4), 319-326. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.02.003>
- Van Heek, N. T., Meeker, A. K., Kern, S. E., Yeo, C. J., Lillemoe, K. D., Cameron, J. L., Offerhaus, G. J. A., Hicks, J. L., Wilentz, R. E., Goggins, M. G., De Marzo, A. M., Hruban, R. H., & Maitra, A. (2002). Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology*, *161*(5), 1541-1547. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64432-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64432-X)
- Vance, K. W., & Ponting, C. P. (2014). Transcriptional regulatory functions of nuclear long noncoding RNAs. *Trends in Genetics*, *30*(8), 348-355. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.06.001>
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, *324*(5930), 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vaupel, P., & Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, *599*(6), 1745-1757. <https://doi.org/10.1113/JP278810>
- Vazquez, F., Lim, J. H., Chim, H., Bhalla, K., Girnun, G., Pierce, K., Clish, C. B., Granter, S. R., Widlund, H. R., Spiegelman, B. M., & Puigserver, P. (2013). PGC1 α expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer Cell*, *23*(3), 287-301. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.11.020>
- Verfaillie, A., Imrichova, H., Atak, Z. K., Dewaele, M., Rambow, F., Hulselmans, G., Christiaens, V., Svetlichnyy, D., Luciani, F., Van den Mooter, L., Claerhout, S., Fiers, M., Journe, F., Ghanem, G.-E., Herrmann, C., Halder, G., Marine, J.-C., & Aerts, S. (2015). Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nature Communications*, *6*, 6683. <https://doi.org/10.1038/ncomms7683>

- Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., & Goggins, M. (2011). Pancreatic cancer. *Lancet (London, England)*, 378(9791), 607-620. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)62307-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)62307-0)
- Vivier, E., & Malissen, B. (2005). Innate and adaptive immunity: Specificities and signaling hierarchies revisited. *Nature Immunology*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/ni1153>
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M., & Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6013), 44-49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
- Von Hoff, D. D., Ervin, T., Arena, F. P., Chiorean, E. G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S. A., Ma, W. W., Saleh, M. N., Harris, M., Reni, M., Dowden, S., Laheru, D., Bahary, N., Ramanathan, R. K., Tabernero, J., Hidalgo, M., Goldstein, D., ... Renschler, M. F. (2013). Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine. *The New England Journal of Medicine*, 369(18), 1691-1703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1304369>
- Waalder, J., Mygland, L., Tveita, A., Strand, M. F., Solberg, N. T., Olsen, P. A., Aizenshtadt, A., Fauskanger, M., Lund, K., Brinch, S. A., Lycke, M., Dybing, E., Nygaard, V., Bøe, S. L., Heintz, K.-M., Hovig, E., Hammarström, C., Corthay, A., & Krauss, S. (2020). Tankyrase inhibition sensitizes melanoma to PD-1 immune checkpoint blockade in syngeneic mouse models. *Communications Biology*, 3(1), 196. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-0916-2>
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., & Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Research*, 68(15), 6368-6376. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6768>
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., & Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(12), 5510-5514. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.12.5510>
- Wang, J. X., Fukunaga-Kalabis, M., & Herlyn, M. (2016). Crosstalk in skin: Melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *Journal of Cell Communication and Signaling*, 10(3), 191-196. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0349-3>
- Wang, R., He, Y., Robinson, V., Yang, Z., Hessler, P., Lasko, L. M., Lu, X., Bhathena, A., Lai, A., Uziel, T., & Lam, L. T. (2018). Targeting Lineage-specific MITF Pathway in Human Melanoma Cell Lines by A-485, the Selective Small-molecule Inhibitor of p300/CBP. *Molecular Cancer Therapeutics*, 17(12), 2543-2550. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0511>
- Wang, S., Zheng, Y., Yang, F., Zhu, L., Zhu, X. Q., Wang, Z. F., Wu, X. L., Zhou, C. H., Yan, J. Y., Hu, B. Y., Kong, B., Fu, D. L., Bruns, C., Zhao, Y., Qin, L. X., & Dong, Q. Z. (2021). The molecular biology of pancreatic adenocarcinoma: Translational challenges and clinical

- perspectives. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 249. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00659-4>
- Wang, X., Teng, F., Kong, L., & Yu, J. (2016). PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets and therapy*, 9, 5023-5039. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105862>
- Wang-Gillam, A., Li, C.-P., Bodoky, G., Dean, A., Shan, Y. S., Jameson, G., Macarulla, T., Lee, K. H., Cunningham, D., Blanc, J. F., Hubner, R. A., Chiu, C. F., Schwartzmann, G., Siveke, J. T., Braiteh, F., Moyo, V., Belanger, B., Dhindsa, N., Bayever, E., ... NAPOLI-1 Study Group. (2016). Nanoliposomal irinotecan with fluorouracil and folinic acid in metastatic pancreatic cancer after previous gemcitabine-based therapy (NAPOLI-1): A global, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 387(10018), 545-557. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00986-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00986-1)
- Wani, A. K., Akhtar, N., Mir, T. U. G., Singh, R., Jha, P. K., Mallik, S. K., Sinha, S., Tripathi, S. K., Jain, A., Jha, A., Devkota, H. P., & Prakash, A. (2023). Targeting Apoptotic Pathway of Cancer Cells with Phytochemicals and Plant-Based Nanomaterials. *Biomolecules*, 13(2), 194. <https://doi.org/10.3390/biom13020194>
- Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123(3191), 309-314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Waters, A. M., & Der, C. J. (2018). KRAS: The Critical Driver and Therapeutic Target for Pancreatic Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(9), a031435. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031435>
- Wellbrock, C., & Arozarena, I. (2015). Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 28(4), 390-406. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12370>
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., & Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One*, 3(7), e2734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002734>
- Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Price, E. R., Cui, J., Lessnick, S. L., Wu, M., He, X., & Fisher, D. E. (2002). Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor. *The Journal of Cell Biology*, 158(6), 1079-1087. <https://doi.org/10.1083/jcb.200202049>
- Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O., & Ngai, S. C. (2018). E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 121, 11-22. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.11.010>

- Wu, Z., Connolly, J., & Biggar, K. K. (2017). Beyond histones – the expanding roles of protein lysine methylation. *The FEBS Journal*, *284*(17), 2732-2744. <https://doi.org/10.1111/febs.14056>
- Xie, Z., & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: Core machinery and adaptations. *Nature Cell Biology*, *9*(10), 1102-1109. <https://doi.org/10.1038/ncb1007-1102>
- Xing, S., & Ferrari de Andrade, L. (2020). NKG2D and MICA/B shedding: A 'tag game' between NK cells and malignant cells. *Clinical & Translational Immunology*, *9*(12), e1230. <https://doi.org/10.1002/cti2.1230>
- Xu, W., Gong, L., Haddad, M. M., Bischof, O., Campisi, J., Yeh, E. T., & Medrano, E. E. (2000). Regulation of microphthalmia-associated transcription factor MITF protein levels by association with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Experimental Cell Research*, *255*(2), 135-143. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4803>
- Yan, X., Hu, Z., Feng, Y., Hu, X., Yuan, J., Zhao, S. D., Zhang, Y., Yang, L., Shan, W., He, Q., Fan, L., Kandalaf, L. E., Tanyi, J. L., Li, C., Yuan, C.-X., Zhang, D., Yuan, H., Hua, K., Lu, Y., ... Zhang, L. (2015). Comprehensive Genomic Characterization of Long Non-coding RNAs across Human Cancers. *Cancer Cell*, *28*(4), 529-540. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.09.006>
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J. M., Dell'antonio, G., Mautner, J., Tonon, G., Haigis, M., Shirihai, O. S., Doglioni, C., Bardeesy, N., & Kimmelman, A. C. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & Development*, *25*(7), 717-729. <https://doi.org/10.1101/gad.2016111>
- Yang, Y., & Bedford, M. T. (2013). Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(1), 37-50. <https://doi.org/10.1038/nrc3409>
- Yasumoto, K., Takeda, K., Saito, H., Watanabe, K., Takahashi, K., & Shibahara, S. (2002). Microphthalmia-associated transcription factor interacts with LEF-1, a mediator of Wnt signaling. *The EMBO Journal*, *21*(11), 2703-2714. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.11.2703>
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., & Shibahara, S. (1994). Microphthalmia-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(12), 8058-8070. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.12.8058-8070.1994>
- Ying, H., Dey, P., Yao, W., Kimmelman, A. C., Draetta, G. F., Maitra, A., & DePinho, R. A. (2016). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development*, *30*(4), 355-385. <https://doi.org/10.1101/gad.275776.115>
- Ying, H., Kimmelman, A. C., Lyssiotis, C. A., Hua, S., Chu, G. C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J. W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J. L., Yan, H., Wang, W., Chen, S., Viale, A., Zheng, H., Paik, J., Lim, C., Guimaraes, A. R., Martin, E. S., ... DePinho, R. A. (2012).

- Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism. *Cell*, 149(3), 656-670. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.058>
- Yoshida, G. J. (2015). Metabolic reprogramming: The emerging concept and associated therapeutic strategies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 34, 111. <https://doi.org/10.1186/s13046-015-0221-y>
- Yuan, S., Norgard, R. J., & Stanger, B. Z. (2019). Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery*, 9(7), 837-851. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-0015>
- Zeng, H., Judson-Torres, R. L., & Shain, A. H. (2020). The Evolution of Melanoma—Moving beyond Binary Models of Genetic Progression. *The Journal of Investigative Dermatology*, 140(2), 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.002>
- Zhang, E., & Xu, H. (2017). A new insight in chimeric antigen receptor-engineered T cells for cancer immunotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 10(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0379-6>
- Zhang, J., Liu, J., Sun, J., Chen, C., Foltz, G., & Lin, B. (2014). Identifying driver mutations from sequencing data of heterogeneous tumors in the era of personalized genome sequencing. *Briefings in Bioinformatics*, 15(2), 244-255. <https://doi.org/10.1093/bib/bbt042>
- Zhang, L., Sanderson, S. O., Lloyd, R. V., & Smyrk, T. C. (2007). Pancreatic intraepithelial neoplasia in heterotopic pancreas: Evidence for the progression model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology*, 31(8), 1191-1195. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31806841e1>
- Zhang, T., Zhou, Q., Ogmundsdottir, M. H., Möller, K., Siddaway, R., Larue, L., Hsing, M., Kong, S. W., Goding, C. R., Palsson, A., Steingrimsson, E., & Pignoni, F. (2015). Mitf is a master regulator of the v-ATPase, forming a control module for cellular homeostasis with v-ATPase and TORC1. *Journal of Cell Science*, 128(15), 2938-2950. <https://doi.org/10.1242/jcs.173807>
- Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 165. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00990-3>
- Zhang, Y., & Xiong, Y. (2001). Control of p53 Ubiquitination and Nuclear Export by MDM2 and ARF1. *Cell Growth & Differentiation*, 12(4), 175-186.
- Zhang, Y., & Zhang, Z. (2020). The history and advances in cancer immunotherapy: Understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular & Molecular Immunology*, 17(8), 807-821. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-0488-6>
- Zhao, H., & Zheng, B. (2019). Dual Targeting of Autophagy and MEK in KRAS Mutant Cancer. *Trends in Cancer*, 5(6), 327-329. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.04.003>

- Zhao, Z., & Liu, W. (2020). Pancreatic Cancer: A Review of Risk Factors, Diagnosis, and Treatment. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 19, 1533033820962117. <https://doi.org/10.1177/1533033820962117>
- Zhu, S. Y., & Yu, K. D. (2022). Breast Cancer Vaccines: Disappointing or Promising? *Frontiers in Immunology*, 13, 828386. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.828386>
- Zoncu, R., Bar-Peled, L., Efeyan, A., Wang, S., Sancak, Y., & Sabatini, D. M. (2011). mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6056), 678-683. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>
- Zou, W., Wolchok, J. D., & Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Science Translational Medicine*, 8(328), 328rv4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aad7118>

Recursos electrónicos:

- ATCC: <https://www.atcc.org/>
- Cellosaurus: <https://www.cellosaurus.org/>
- Cistrome: <http://cistrome.org/>
- Enclave de ciencia: <https://enclavedeciencia.rae.es/contenidos/inicio>
- Ensembl: <https://www.ensembl.org/index.html>
- GLOBOCAN: <https://gco.iarc.fr/>
- *McMaster Pathophysiology Review*: <http://www.pathophys.org/melanoma/>
- *National Cancer Institute*: <https://www.cancer.gov/>
- *National Cancer Institute Visuals Online*: <https://visualsonline.cancer.gov/>
- REDECAN: <https://redcan.org/es>
- TCGA: <https://www.cancer.gov/ccg/research/genome-sequencing/tcga>
- *Vector Stock*: <https://www.vectorstock.com/>

