

CÓMO CONVERTIR LA RESISTENCIA EN EL TALÓN DE AQUILES DEL MELANOMA

María Piedad Fernández-Pérez¹, LuíS Sánchez-del-Campo², Magalí Sáez-Ayala¹, María F. Montenegro¹, Soledad Chazarra¹ y José Neptuno Rodríguez-López¹

1. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Universidad de Murcia.

2. Nuffield Department of Clinical Medicine, Ludwig Institute for Cancer Research, University of Oxford
E-mail: mfp18858@um.es

Melanocitos y melanoma

Los melanocitos son las células responsables de la síntesis de melaninas, que son los pigmentos que proporcionan el color a la piel, el pelo y los ojos y los protegen de la luz ultravioleta (UV). Estos pigmentos son sintetizados y almacenados por los melanocitos en unos orgánulos especiales denominados melanosomas que derivan de endosomas tempranos que sufren una maduración específica de este tipo celular durante la cual incorporan una serie de proteínas estructurales y enzimas implicadas en la síntesis de melanina (Raposo y Marks, 2007).

En la piel, los melanocitos se distribuyen en la membrana basal, situada entre la epidermis y la dermis, desde donde transfieren los melanosomas a los queratinocitos circundantes mediante un mecanismo de transporte que ocurre a nivel de sus dendritas. Los queratinocitos captan los melanosomas y los disponen alrededor de su núcleo para proteger al ADN del daño ocasionado por la luz UV. A su vez, los queratinocitos epidérmicos secretan una serie de factores que regulan la homeostasis de los melanocitos (Sloinski et al., 2004) (Figura 1).

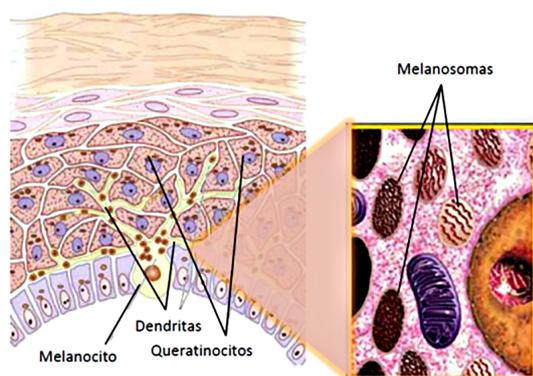


Figura 1. Melanocitos y distribución de melanina en la piel. Los melanocitos epidérmicos son las células encargadas de dar coloración a la piel y protegerla de la luz UV gracias a su capacidad de sintetizar y almacenar melanina en los melanosomas. Estas células se sitúan en la membrana basal y, desde aquí, distribuyen los melanosomas a los queratinocitos circundantes por un mecanismo de transporte que ocurre a nivel de sus dendritas.

Imágenes extraídas y adaptadas de:
<http://www.pgbeautyroomingscience.com/skin-color.php>
<http://www.eucerin.com/my/skin-expertise/about-the-skin-s-unlight-and-sun-protection/skin-s-intrinsic-photoprotection/>

El melanoma cutáneo es un tipo de cáncer de piel que se origina por transformación maligna de los melanocitos epidérmicos o de sus células madre, principalmente por el daño al ADN inducido por la radiación UV (Goding, 2007). Se piensa que esta neoplasia

se desarrolla según un modelo de progresión secuencial. Según este modelo, en primer lugar se produciría una proliferación aberrante de los melanocitos debido a alguna alteración genética, presumiblemente causada por la radiación UV, que les permitiría escapar a la estrecha regulación por los queratinocitos dando lugar a los nevos o lunares. Se trata de lesiones hiperplásicas benignas consistentes en una población clonal de melanocitos que no progresan gracias a los mecanismos de senescencia celular. Si continúan acumulándose alteraciones genéticas, los nevos sobrepasan los mecanismos de senescencia celular, se vuelven displásicos y pueden progresar a una fase de crecimiento radial (RGP) en la que se produce una extensión superficial de los melanocitos confinada a la epidermis y con bajo potencial invasivo. Finalmente, la sucesiva acumulación de alteraciones genéticas hace que las células pasen a una fase de crecimiento vertical (VGP) en la que adquieren la capacidad de invadir la dermis y alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos para metastatizar (preferentemente en hígado, pulmón y cerebro). Sin embargo, hay que tener en cuenta que no todos los melanomas se originan a partir de nevos pre-existentes, sino que también pueden originarse a partir de melanocitos aislados, ni tampoco todos los melanomas pasan por todas estas fases (Zaidi et al., 2008) (Figura 2).

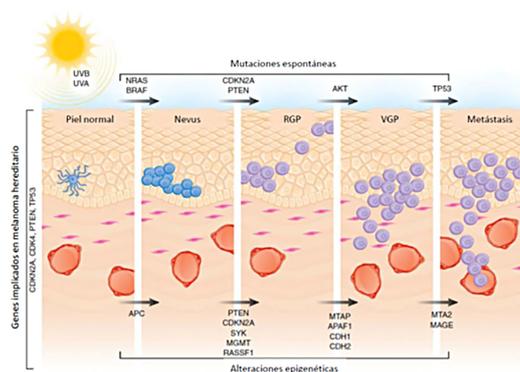


Figura 2. Modelo de iniciación y progresión del melanoma humano. El melanoma humano se origina según un modelo de progresión secuencial, impulsado por el acumulo progresivo de alteraciones genéticas y epigenéticas, en el que el principal agente etiológico sería la luz UV. En primer lugar, una proliferación aberrante de los melanocitos daría lugar a la formación de nevos o lunares. A continuación se produciría una fase de crecimiento radial (RGP) localizada en la epidermis, seguida de una fase de crecimiento vertical (VGP) en la que las células de melanoma invadirían la dermis y podrían alcanzar vasos sanguíneos o linfáticos para metastatizar, preferentemente a hígado, pulmón y cerebro.

Imagen extraída y adaptada de: Zaidi et al., 2008.

La detección y la extirpación quirúrgica del melanoma en las fases tempranas de su evolución biológica son determinantes para la supervivencia de los

pacientes. La mayoría de las lesiones tempranas y algunos melanomas en estadios más avanzados pueden ser identificados empleando la regla ABCDE. Según este criterio, los melanomas son **A**simétricos (no pueden dividirse en dos mitades iguales), tienen **B**ordes irregulares, muestran un **C**olor no homogéneo, su **D**íametro suele ser superior a 6 mm y su **E**volución cambia con el tiempo (Friedman et al., 1985; Abbasi et al., 2004) (Figura 3).

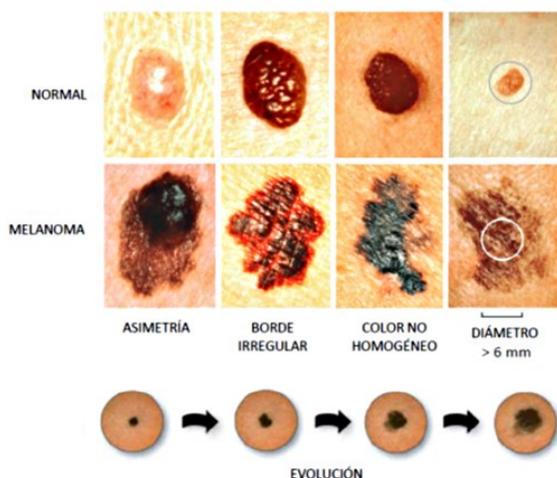


Figura 3. Regla ABCDE para la detección temprana del melanoma. Los melanomas son **A**simétricos, presentan **B**ordes irregulares o festoneados, muestran un **C**olor no homogéneo (dos o más tonos: marrón, rojizo, negrozco), tienen un **D**íametro superior a 6mm y **E**volucionan, es decir, sus características cambian con el tiempo.

Imagen extraída y adaptada de: <http://www.skinhairsurgery.com/Mediskincare.html>

Cuando un mecanismo defensivo se convierte en ofensivo

El melanoma cutáneo es el cáncer que mayor incremento ha sufrido en cuanto a incidencia y mortalidad en las últimas décadas en la población caucásica y se trata del tipo de cáncer de piel más agresivo (Giblin y Thomas, 2007). Los pacientes con enfermedad avanzada que presentan afectación de ganglios linfáticos o metástasis distantes tienen unas tasas de supervivencia media a 5 años del 50% y del 10-20%, respectivamente (Grossman y Altieri, 2001). El único tratamiento efectivo es la escisión quirúrgica de las lesiones tempranas, ya que el melanoma maligno muestra una gran resistencia frente a todas las terapias anti-cancerígenas disponibles en la actualidad.

Durante décadas, los clínicos y los científicos básicos han estado desconcertados por la gran capacidad que presentan las células de melanoma para escapar a los mecanismos de vigilancia del sistema inmune, para resistir a la inmunoterapia y a la radioterapia, así como para evadir la acción de una gran diversidad de agentes quimioterapéuticos (agentes que causan

daño al DNA, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de topoisomerasas, etc.). Tanto es así que, después del tratamiento con quimioterapia, raramente experimentan beneficios más de un 20% de los pacientes y el término “remisión” es prácticamente inexistente en melanoma. Por tanto, se postula que la gran resistencia a las distintas terapias probablemente no sea consecuencia de la adquisición de alteraciones genéticas durante o después del tratamiento, sino que más bien la resistencia sería una capacidad inherente a las células de melanoma ya presente en el momento del diagnóstico. Diversos estudios postulan que las células de melanoma “nacen para sobrevivir” y que su comportamiento agresivo provendría de características intrínsecas de supervivencia de sus progenitores, los melanocitos, que se verían incrementadas por alteraciones adicionales adquiridas durante la progresión del tumor. (Soengas y Lowe, 2003)

Los antifolatos fueron los primeros antimetabólitos en incorporarse a la clínica a finales de la década de 1940. Estos agentes, entre los que destaca el metotrexato (MTX), actúan como inhibidores competitivos de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que es la enzima clave en el metabolismo del ácido fólico. Su descubrimiento se produjo a raíz de la observación de que la administración de suplementos de ácido fólico a los pacientes con leucemia linfoblástica aguda empeoraba su evolución, mientras que una dieta pobre en ácido fólico producía una notable mejoría (Meyer et al., 1950). En las siguientes décadas, la efectividad demostrada frente a diversos tipos de cáncer popularizó el uso de MTX e hizo que éste se incorporara a los distintos regímenes anti-cancerígenos (Bertino, 2000). Sin embargo, no tardaron en aparecer estudios en los que se describía la ausencia de efectividad del MTX en el tratamiento del melanoma debido a una resistencia que parecía ser natural o intrínseca (Kufe et al., 1980).

Desde su descubrimiento hasta la actualidad, los mecanismos generales de resistencia al MTX han sido ampliamente estudiados (Assaraf, 2007). Sin embargo, hasta hace unos años poco se sabía acerca de los mecanismos específicos de resistencia a esta droga en las células de melanoma. Experimentos realizados en nuestro laboratorio y otros han proporcionado evidencias de la existencia de un nuevo mecanismo de resistencia, específico del melanoma frente a diversas drogas citotóxicas, que consistiría en su secuestro en los melanosomas y su posterior exportación al exterior celular (Chen et al., 2006; Sánchez del Campo et al., 2009a). Concretamente, nuestro laboratorio puso de manifiesto que el transporte de MTX por endocitosis mediada por el FR α (folate receptor alpha) conducía, de alguna manera, al secuestro del MTX en el interior de los melanosomas y a su exportación al exterior celular, lo cual reducía la acumulación intracelular de la droga y hacía que ésta solo fuera capaz de detener el crecimiento de las células de melanoma pero no de inducir su muerte (Sánchez del Campo et al., 2009a) (Figura 4).

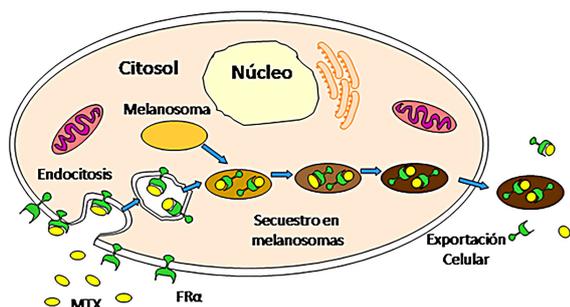


Figura 4. Mecanismo de resistencia específico del melanoma frente a drogas citotóxicas como el MTX. El transporte de MTX por endocitosis mediada por el FR α (*folate receptor alpha*) conduce al secuestro del MTX en los melanosomas y a su exportación al exterior celular, lo cual reduce la concentración intracelular de la droga y hace que ésta actúe como citoestática en lugar de citotóxica.

En melanocitos normales la síntesis de melanina y la biogénesis y transporte de melanosomas se activa tras la exposición solar y tiene como objetivo aumentar la pigmentación de la piel para proteger al organismo de la radiación UV (Lin y Fisher, 2007). Sin embargo, este mecanismo “defensivo” frente a la radiación solar en los melanocitos normales, se tornaría en un arma “ofensiva” de las células de melanoma al permitirles expulsar drogas citotóxicas como el MTX.

Nuestros resultados sugerían que el MTX podía estar activando la maquinaria responsable de la biogénesis y el transporte de los melanosomas favoreciendo así su propia eliminación del interior celular. Pero el mecanismo molecular por el cual el MTX controlaba estos procesos celulares era desconocido.

Dadas las limitadas opciones terapéuticas existentes para los pacientes con melanoma metastásico, en nuestro laboratorio decidimos centrar nuestros esfuerzos en descifrar las bases moleculares que subyacen a este particular mecanismo de resistencia al MTX con el objetivo de identificar nuevas dianas terapéuticas para el diseño de terapias combinadas encaminadas a evadir dicha resistencia.

¿Cómo es capaz el MTX de orquestrar su propia expulsión celular?

Diversos autores han puesto de manifiesto la gran similitud existente entre el desarrollo de un tumor y ciertos procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario (Ma et al., 2010). El ejemplo más claro y mejor estudiado lo encontramos en el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT) que durante el desarrollo embrionario permite que las células progenitoras migren hacia aquellas localizaciones donde se diferenciarán para formar tejidos y órganos. Pues bien, la reactivación en las células tumorales del programa de transición epitelio-mesénquima permite a las células ya diferenciadas restituir propiedades embrionarias tales como la capacidad migratoria e

invasiva que facilita la diseminación de las células del tumor primario a otros tejidos (Micalizzi y Ford, 2009). Por esta razón algunos autores se han aventurado a postular que el desarrollo de un tumor sería como “un intento de formar un órgano pero en un lugar y en un momento equivocados”.

Como hemos dicho anteriormente, las dos principales características indicadoras de diferenciación en melanocitos son: a) la morfología dendrítica, necesaria para la correcta distribución de melanina en la piel, y b) la capacidad de sintetizar y almacenar melanina en los melanosomas, así como de exportarlos hacia los queratinocitos circundantes (Ibrahim y Haluska, 2009). Pues bien, el tratamiento con MTX parecía estar induciendo diferenciación en las células de melanoma puesto que, no solo parecía activar la síntesis de melanina y la biogénesis y exportación de melanosomas, sino que además producía un llamativo cambio morfológico induciendo una fuerte dendricidad en estas células (Figura 7B). Ante estos hallazgos nos planteamos adentrarnos en el estudio del origen de los melanocitos durante el desarrollo embrionario, con la esperanza de encontrar similitudes con los procesos desencadenados por el tratamiento con MTX.

Los melanocitos se originan a partir de células precursoras no pigmentadas derivadas de la cresta neural denominadas melanoblastos que, durante el desarrollo embrionario, migran hacia determinadas localizaciones en el ojo, el oído interno, la epidermis y los folículos pilosos, donde se diferencian hacia melanocitos maduros (Ernfors, 2010). Éstos se caracterizan principalmente por su aspecto dendrítico y su capacidad de sintetizar y almacenar melanina en los melanosomas, así como de exportarlos hacia los queratinocitos circundantes (Ibrahim y Haluska, 2009). El punto crítico que compromete a estos precursores pluripotentes para su diferenciación hacia el linaje melanocítico es la activación de la expresión del factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) (Goding, 2000). De hecho, diversos estudios han demostrado que la expresión de MITF en células madre embrionarias es suficiente para inducir su diferenciación hacia melanocitos (Béjar, 2003). Se trata de uno de los principales marcadores específicos del linaje melanocítico (Goding, 2007) que, además de regular el proceso de diferenciación, actúa como un modulador clave de la supervivencia y la proliferación de los melanocitos (Widlund y Fisher, 2003).

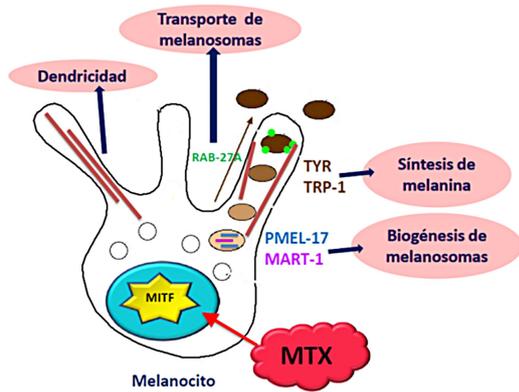


Figura 5. El MTX orquesta su propia expulsión al exterior celular a través de la inducción del factor de transcripción MIF. El tratamiento con MTX induce la expresión del factor de transcripción MIF el cual inicia el programa de diferenciación melanocítica en las células de melanoma induciendo la expresión de genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de melanina, la biogénesis y el transporte de melanosomas que conduce a la expulsión de la droga incluida en el interior de los melanosomas.

Dado que MIF parecía ser un punto clave en la diferenciación melanocítica, nos planteamos averiguar si este factor de transcripción podría estar implicado en el mecanismo de resistencia del melanoma al MTX descrito por nuestro grupo de investigación. Estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que el tratamiento con MTX inducía fuertemente la expresión del factor de transcripción MIF en células de melanoma, el cual iniciaba el programa de diferenciación melanocítica gracias a la activación de la expresión de genes que codifican:

- a) proteínas estructurales de los melanosomas (como PMEL-17 y MART-1), a los que iría a parar el MTX tras ser endocitado.
- b) enzimas implicadas en la síntesis de melanimas (como TYR y TYRP-1), que interaccionarían con el MTX secuestrándolo en el interior del MTX.
- c) proteínas implicadas en el transporte de melanosomas al exterior celular (como RAB-27a), que conducirían a la expulsión del MTX incluido en el interior de los melanosomas.

Por tanto, la inducción de dicho factor de transcripción por el MTX era responsable de la puesta en marcha de la biogénesis y exportación de melanosomas y, por ende, del mecanismo de resistencia descrito anteriormente por el que el MTX es secuestrado en los melanosomas y exportado al exterior celular (Sáez-Ayala et al., 2013) (Figura 5).

Como en el caso de otros tumores, en el interior de un melanoma coexisten distintas sub-poblaciones de células cancerígenas que muestran distintas propiedades biológicas y distinto grado de diferenciación. Algunas de estas células podrían exhibir rasgos de diferenciación, otras podrían mostrar mayor capacidad

proliferativa y solo unos pocos clones de células más indiferenciadas presentarían propiedades similares a las de las células madre (Visvader y Lindeman, 2008). Éstas últimas son las denominadas “cancer stem cells (CSC)” o “células madre del cáncer” que tendrían capacidad tanto de auto-renovación para mantener el pool de células madre del cáncer, como de diferenciación para dar lugar a toda una progenie de células tumorales. Los últimos estudios apuntan a que serían éstas las responsables de la iniciación y el mantenimiento del tumor, así como de las metástasis y las recaídas tras remisiones logradas con la quimioterapia (Mena, 2009) (Figura 6).

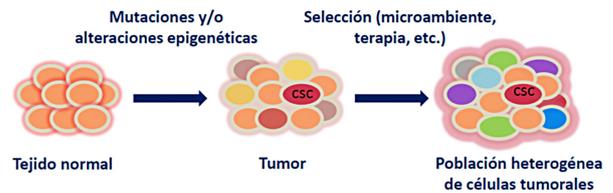


Figura 6. Heterogeneidad tumoral. A medida que el tumor progresa pueden encontrarse diferentes subpoblaciones de células tumorales con distinto grado de diferenciación y diferentes propiedades biológicas. Solo unas pocas células denominadas células madre del cáncer (“cancer stem cells” o “CSCs”) tendrían la capacidad de iniciar y mantener el tumor, y serían responsables del desarrollo de metástasis y de recaídas tras la quimioterapia.

En melanoma, la identidad de las distintas subpoblaciones de células tumorales viene determinada por los niveles de expresión de MIF (Carreira et al., 2006; Cheli et al., 2011). De esta manera, aquellas células con baja expresión de MIF muestran propiedades de célula madre, tienen gran capacidad de iniciar tumores y son altamente invasivas (Carreira et al., 2006; Cheli et al., 2011). Por el contrario, aquellas células con elevada expresión de MIF presentan un bajo potencial invasivo y expresan genes de diferenciación que conducen a la producción de melanina y a la biogénesis y transporte de melanosomas (Cheli et al., 2010). Entre ambas estarían aquellas células con niveles de expresión intermedios que serían las que tendrían capacidad proliferativa. Puesto que los melanomas suponen una mezcla de células con distintos niveles de expresión de MIF, la inducción de la expresión de este factor de transcripción por el tratamiento con MTX conseguiría reducir la heterogeneidad celular existente en el tumor y, con ella, la probabilidad de que existan en el tumor células capaces de eludir terapias dirigidas contra dianas moleculares concretas. Además, esta terapia eliminaría aquellas células que expresan bajos niveles de MIF y muestran un fenotipo de células madre que son altamente invasivas (Sáez-Ayala et al., 2013) (Figura 7).

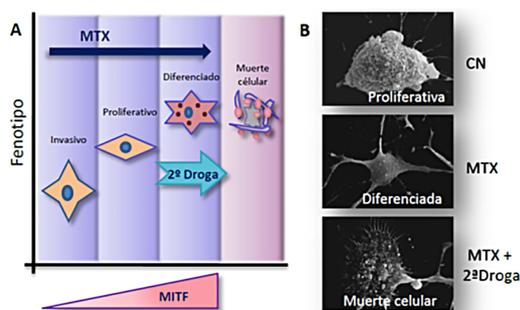


Figura 7. Regulación de la identidad celular en melanoma por los niveles de MITF y estrategia en dos etapas para la terapia del melanoma. A) En melanoma, el nivel de expresión de MITF determina la identidad de las distintas sub-poblaciones de células tumorales. Las células con baja expresión de MITF muestran un fenotipo invasivo. Las células con elevada expresión de MITF presentan un bajo potencial invasivo y expresan genes de diferenciación. Las células con niveles de expresión intermedios tendrían capacidad proliferativa. El tratamiento con MTX induce la expresión de MITF que pone en marcha el programa de diferenciación en las células de melanoma y, con ello, lleva a las células a un fenotipo común más sensible al tratamiento con un segundo fármaco. B) Imágenes de microscopía electrónica de barrido de células de melanoma proliferativas (CN), de células diferenciadas tras el tratamiento con MTX y de células apoptóticas tras el tratamiento con una terapia combinada de MTX junto con una segunda droga dirigida frente a células diferenciadas.

Por un lado, el descubrimiento de las bases moleculares de este mecanismo de resistencia ha abierto el camino al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares implicadas en el proceso, tales como proteínas implicadas en el transporte de los melanosomas o enzimas implicadas en la síntesis de melanina. Pero lo más importante de este descubrimiento es que el tratamiento con MTX, al inducir la diferenciación de las células de melanoma, supone una herramienta para reducir la heterogeneidad existente en el tumor al conducir a todas las células tumorales a un fenotipo común, sensible a otras terapias dirigidas específicamente contra células más diferenciadas.

Cuando los árboles no dejan ver el bosque...

En las últimas décadas, los avances en el conocimiento de la genética y la biología molecular del cáncer han permitido identificar un gran número de dianas terapéuticas, es decir, moléculas que desempeñan una función esencial en los procesos patológicos que dan lugar al desarrollo del cáncer y, por lo tanto, son el objetivo para el desarrollo de fármacos anti-cancerígenos. Con esta finalidad se han seguido fundamentalmente dos estrategias. Por un lado, el "diseño racional" consistente en el diseño de fármacos basado en el conocimiento de la estructura molecular de la diana terapéutica (van Montfort y Workman, 2009). Y, por otro lado, el screening a gran escala de grandes bibliotecas de compuestos químicos sintéticos o naturales en busca de aquellos capaces de bloquear o estimular una diana terapéutica, o bien de destruir células neoplásicas en cultivo (Shoemaker et al., 2002). Pero ambas estrategias pasan por alto aquellos compuestos que no presentan la actividad deseada o aquellos frente a los cuales las células cancerígenas muestran resistencia.

Dada la gran resistencia del melanoma frente a todas las terapias clásicamente utilizadas y la escasa efectividad de las nuevas terapias dirigidas frente a

dianas moleculares específicas, en nuestro laboratorio decidimos emplear un enfoque diferente. En lugar de descartar una droga como el MTX para la que se sabía desde hacía décadas que el melanoma es resistente, intentamos descifrar las bases moleculares del mecanismo de resistencia para identificar dianas terapéuticas a las que disparar con un segundo fármaco para intentar evadir dicha resistencia. Con este nuevo enfoque, nuestro grupo de investigación ha logrado desarrollar varias estrategias terapéuticas distintas con excelentes resultados pre-clínicos que resultan esperanzadores para el tratamiento del melanoma en estadios avanzados para el que, a día de hoy, sigue sin haber una terapia efectiva.

Bibliografía

- Abbasi, N. R., H. M. Shaw, D. S. Rigel, R. J. Friedman, W. H. McCarthy, I.
- Osman, A. W. Kopf and D. Polsky (2004). "Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria." *JAMA* 292(22): 2771-2776.
- Assaraf, Y. G. (2007). "Molecular basis of antifolate resistance." *Cancer Metastasis Rev* 26(1): 153-181.
- Bertino and J.R. (2000). *Methotrexate: historical aspects*. B. J. R. E. Cronstein B.N. Basel: Birkhäuser, Deutsche Bibliothek: 1-8.
- Béjar, J., Y. Hong and M. Schartl (2003). "Mitf expression is sufficient to direct differentiation of medaka blastula derived stem cells to melanocytes." *Development* 130(26): 6545-6553.
- Carreira, S., J. Goodall, L. Denat, M. Rodriguez, P. Nuciforo, K. S. Hoek, A. Testori, L. Larue and C. R. Goding (2006). "Mitf regulation of *Dia1* controls melanoma proliferation and invasiveness." *Genes Dev* 20(24): 3426-3439.
- Cheli, Y., S. Giuliano, S. Giuliano, T. Botton, S. Rocchi, V. Hofman, P. Hofman, P. Bahadoran, C. Bertolotto and R. Ballotti (2011). "Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny." *Oncogene* 30(20): 2307-2318.
- Cheli, Y., M. Ohanna, R. Ballotti and C. Bertolotto (2010). "Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes." *Pigment Cell Melanoma Res* 23(1): 27-40.
- Chen, K. G., J. C. Valencia, B. Lai, G. Zhang, J. K. Paterson, F. Rouzaud, W. Berens, S. M. Wincovitch, S. H. Garfield, R. D. Leapman, V. J. Hearing and M. M. Gottesman (2006). "Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26): 9903-9907.

- Ernfor, P. (2010). Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes. *Exp Cell Res* 316(8): 1397-1407.
- Friedman, R. J. and D. S. Rigel (1985). "The clinical features of malignant melanoma." *Dermatol Clin* 3(2): 271-283.
- Giblin, A. V. and J. M. Thomas (2007). Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 60(1): 32-40.
- Goding, C. R. (2000). "Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage." *Genes Dev* 14(14): 1712-1728.
- Goding, C. R. (2007). "Melanocytes: the new Black." *Int J Biochem Cell Biol* 39(2): 275-279.
- Grossman, D. and D. C. Altieri (2001). "Drug resistance in melanoma: mechanisms, apoptosis, and new potential therapeutic targets." *Cancer Metastasis Rev* 20(1-2): 3-11.
- Kufe, D. W., M. M. Wick and H. T. Abelson (1980). "Natural resistance to methotrexate in human melanomas." *J Invest Dermatol* 75(4): 357-359.
- Lin, J. Y. and D. E. Fisher (2007). "Melanocyte biology and skin pigmentation." *Nature* 445(7130): 843-850. Ma, Y., P. Zhang, F. Wang, J. Yang, Z. Yang and H. Qin (2010). "The relationship between early embryo development and tumorigenesis." *J Cell Mol Med* 14(12): 2697-2701.
- Menea, F., R. Houben, M. Eyrich, E. B. Broecker, J. C. Becker and J. Wischhusen (2009). "Stem cells, melanoma and cancer stem cells: the good, the bad and the evil?" *G Ital Dermatol Venereol* 144(3): 287-296.
- MEYER, L. M., F. R. MILLER, M. J. ROWEN, G. BOCK and J. RUTZKY (1950). "Treatment of acute leukemia with amethopterin (4-amino, 10-methyl pteroyl glutamic acid)." *Acta Haematol* 4(3): 157-167.
- Micalizzi, D. S. and H. L. Ford (2009). "Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer." *Future Oncol* 5(8): 1129-1143.
- Raposo, G. and M. S. Marks (2007). "Melanosomes—dark organelles enlighten endosomal membrane transport." *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10): 786-797.
- Shoemaker, R. H., D. A. Scudiero, G. Melillo, M. J. Currens, A. P. Monks, A. A. Rabow, D. G. Covell and E. A. Sausville (2002). "Application of high-throughput, molecular-targeted screening to anticancer drug discovery." *Curr Top Med Chem* 2(3): 229-246.
- Slominski, A., D. J. Tobin, S. Shibahara and J. Wortsman (2004). "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation." *Physiol Rev* 84(4): 1155-1228.
- Soengas, M. S. and S. W. Lowe (2003). "Apoptosis and melanoma chemoresistance." *Oncogene* 22(20): 3138-3151.
- Sáez-Ayala, M., M. F. Montenegro, L. Sánchez-Del-Campo, M. P. Fernández-Pérez, S. Chazarra, R. Freter, M. Middleton, A. Piñero-Madrona, J. Cabezas-Herrera, C. R. Goding and J. N. Rodríguez-López (2013). "Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy." *Cancer Cell* 24(1): 105-119.
- Sánchez-del-Campo, L., M. F. Montenegro, J. Cabezas-Herrera and J. N. Rodríguez-López (2009). "The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate." *Pigment Cell Melanoma Res* 22(5): 588-600.
- van Montfort, R. L. and P. Workman (2009). "Structure-based design of molecular cancer therapeutics." *Trends Biotechnol* 27(5): 315-328.
- Visvader, J. E. and G. J. Lindeman (2008). "Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions." *Nat Rev Cancer* 8(10): 755-768.
- Widlund, H. R. and D. E. Fisher (2003). "Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival." *Oncogene* 22(20): 3035-3041.
- Zaidi, M. R., C. P. Day and G. Merlino (2008). "From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse." *J Invest Dermatol* 128(10): 2381-2391.