



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**Bases Moleculares de la Resistencia del Melanoma
a los Antifolatos: Diseño de Nuevas Estrategias
Terapéuticas**

María Piedad Fernández Pérez

2015



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. **José Neptuno Rodríguez López**, Catedrático de Universidad del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A de la Universidad de Murcia, y D. **Luís Sánchez del Campo Ferrer**, investigador posdoctoral del *Ludwig Institute for Cancer Research* de Oxford,

AUTORIZAN:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "**BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA DEL MELANOMA A LOS ANTIFOLATOS: DISEÑO DE NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS**"; realizada por **D^a. María Piedad Fernández Pérez**, bajo nuestra inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 16 de Octubre de 2015.

Fdo.: D. José Neptuno Rodríguez
López.
Catedrático de Bioquímica y Biología
Molecular.

Fdo.: D. Luís Sánchez del Campo
Ferrer.
Doctor en Biología.



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR-A

UNIVERSIDAD DE MURCIA

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

DISEÑO DE TERAPIAS COMBINADAS CON ANTIFOLATOS DERIVADOS DE LAS CATEQUINAS DEL TÉ PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER (Proyecto SAF2009-12043-C02-01. Ministerio de Ciencia e Innovación).

MODULACION DE LA METILACIÓN DE PROTEINAS COMO NUEVAS TERAPIAS EPIGENÉTICAS CONTRA TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL (SAF2013-48375-C2-1-R. Ministerio de Economía y Competitividad).

DESARROLLO DE COMBINACIONES TERAPÉUTICAS CONTRA EL MELANOMA Y EL CÁNCER DE MAMA USANDO NUEVOS ANTIFOLATOS DERIVADOS DE LAS CATEQUINAS DEL TÉ. (15230/PI/10. Fundación Séneca. Región de Murcia).

UNA NUEVA GENERACIÓN DE TERAPIAS EPIGENÉTICAS CONTRA TUMORES DE ORIGEN EPITELIAL (19304/PI/14. Fundación Séneca. Región de Murcia).

La autora de esta Tesis Doctoral ha disfrutado de las siguientes ayudas:

BECA-CONTRATO PREDOCTORAL DE LA UNIVERSIDAD DE MURCIA (Universidad de Murcia. Periodo: 01/01/2010-31/10/2010).

BECA-CONTRATO DE FORMACIÓN DE PROFESORADO UNIVERSITARIO (Programa Nacional de Formación de Recursos Humanos de Investigación. Ministerio de Educación. Referencia AP2009-1054. Periodo: 01/11/2010-31/12/2013).

CONTENIDO

PUBLICACIONES.....	I
ÍNDICE.....	III
ABREVIATURAS.....	IX
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS.....	91
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN.....	95
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	185
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	197
CAPÍTULO 6. RESUMEN.....	201
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....	207

PUBLICACIONES

El trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral ha dado lugar a las siguientes Publicaciones en Revistas Científicas:

1. Sáez-Ayala, M., Fernández-Pérez, M.P., Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Chazarra, S., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., y Rodríguez-López, J.N. (2012). Melanoma coordinates general and cell-specific mechanisms to promote methotrexate resistance. *Exp Cell Res* **318**, 1146-1159.
2. 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., *et al.* (2013a). Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy. *Cancer Cell* **24**, 105-119.
3. Fernández-Pérez, M.P., Montenegro, M.F., Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., and Rodríguez-López, J.N. (2013b). Suppression of antifolate resistance by targeting the myosin Va trafficking pathway in melanoma. *Neoplasia* **15**, 826-839.
4. Sáez-Ayala, M., Fernández-Pérez, M.P., Chazarra, S., Mchedlishvili, N., Tárraga-Tomás, A., and Rodríguez-López, J.N. (2013b). Factors influencing the antifolate activity of synthetic tea-derived catechins. *Molecules* **18**, 8319-8341.
5. Montenegro, M.F., Collado-González, M.d.M., Fernández-Pérez, M.P., Hammouda, M.B., Tolordava, L., Gamkrelidze, M., and Rodríguez-López, J.N. (2014). Promoting E2F1-mediated apoptosis in oestrogen receptor- α -negative breast cancer cells. *BMC Cancer* **14**, 539.
6. Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Sáez-Ayala, M., Cabezas-Herrera, J., and Rodríguez-López, J.N. (2015). Targeting the epigenetic machinery of cancer cells. *Oncogene* **34**, 135-143.

Ha dado lugar a la siguiente Publicación de Carácter Divulgativo:

Fernández-Pérez, M.P., Sánchez-del-Campo, L., Sáez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Chazarra, S., Rodríguez-López, J.N. (2013). Cómo convertir la resistencia en el talón de Aquiles del melanoma. *Eubacteria* **32**, 58-63.

Ha dado lugar al siguiente Capítulo de Libro:

Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M.F., Sáez-Ayala, M., Fernández-Pérez, M.P., Cabezas-Herrera, J. y Rodríguez-López, J.N. (2013). Cellular and molecular mechanisms of methotrexate resistance in melanoma. En: *Melanoma – From Early Detection to Treatment* (Ed., Guy Huynh Thien Duc) 392-409.

Ha dado lugar a la siguiente Patente Internacional:

Rodríguez-López, J.N., Fernández-Pérez, M.P., Montenegro, M.F. Methods and compositions to overcome cytotoxic drug resistance in melanoma. País de prioridad: Gran Bretaña. Fecha de prioridad: 23-08-2012. Número de solicitud: GB1212586.0 Entidad Titular: Universidad de Murcia. Empresa que la está explotando: PLANT BIOSCIENCE LIMITED.

Y ha dado lugar a las siguientes Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

1. Sáez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Cabezas-Herrera, J., Goding, C., Rodríguez-López, J.N. Methotrexate promotes MITF-driven phenotype-switching in melanoma. 17th Meeting of the European Society for Pigment Cell Research. Ginebra (Suiza), 2012.
En: *Pigment Cell & Melanoma Research* **25**, 670.
2. Fernández-Pérez, M.P., Sáez-Ayala, M., Rodríguez-López, J.N. E2F1 and Chk1 play an important role in the resistance of melanoma to methotrexate. 22nd IUBMB/37th FEBS congress. From Single Molecules to Systems Biology. Sevilla (España), 2012.
En: *FEBS Journal* **279**- Suppl.1, 58 - 59.
3. Sáez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Chazarra, S., Cabezas-Herrera, J., Goding, C., Rodríguez López, J.N. Directed phenotype-switching as a novel anti-melanoma strategy. Society for Melanoma Research 2012 Congress. Advancement through Collaboration. Hollywood (Estados Unidos), 2012.
En: *Pigment Cell & Melanoma Research* **25**, 883 – 884
4. Sáez-Ayala, M., Montenegro, M.F., Sánchez-del-Campo, L., Fernández-Pérez, M.P., Chazarra, S., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. Deciphering methotrexate resistance mechanisms to improve melanoma therapy. Cell death in Cancer. Amsterdam (Holanda), 2012.
Disponible en Internet en: <<http://goo.gl/Nj9kPF>>. Abstract 25.
5. Fernández-Pérez, M.P., Montenegro, M.F., Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. Targeting Myosin Va as a strategy to prevent cellular export of methotrexate in melanoma. 38th FEBS Congress. San Petersburgo (Rusia), 2013.
En: *FEBS Journal* **280** - Suppl.1, 390.
6. Fernández-Pérez, M.P., Montenegro, M.F., Sáez-Ayala, M., Sánchez-del-Campo, L., Piñero-Madrona, A., Cabezas-Herrera, J., Rodríguez-López, J.N. UCN-01 as a new tool to block drug export in melanoma. FEBS-EMBO 2014 Conference. París (Francia), 2014.
En: *FEBS Journal* **281** - Suppl.1, 515.

ÍNDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CÁNCER.....	3
1.1.1. CONCEPTOS GENERALES	3
1.1.2. GENÉTICA DEL CÁNCER	4
1.1.3. LOS RASGOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER.....	6
1.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa.....	7
1.1.3.2. Evasión de las señales supresoras del crecimiento.....	9
Vía supresora tumoral de RB.....	9
Vía supresora tumoral de p53	10
Vía supresora tumoral de p73	11
1.1.3.3. Resistencia a la muerte celular.....	12
1.1.3.4. Potencial replicativo ilimitado.....	13
1.1.3.5. Inducción de la angiogénesis.....	15
1.1.3.6. Invasión y metástasis.....	16
1.1.3.7. Características facilitadoras.....	18
Inestabilidad genética.....	18
Inflamación promotora del tumor.....	18
1.1.3.8. Características emergentes	19
Reprogramación del metabolismo energético	19
Evasión de la destrucción por el sistema inmune	20
1.2. CÁNCER DE PIEL.....	21
1.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA	21
1.2.2. MELANOMA	22
1.2.2.1. Melanocitos y melanoma	22
1.2.2.2. Patogénesis del melanoma.....	23
1.2.2.3. Clasificación histológica del melanoma.....	24
1.2.2.4. Epidemiología	24
1.2.2.5. Factores de riesgo en melanoma	26
1.2.2.6. Bases moleculares del melanoma	29
<i>Loc</i> i genéticos y variantes asociados con melanoma familiar	29
Otras vías moleculares implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma	31
Vía de las MAPK.....	31
Vía del Retinoblastoma.....	33

Vía de p53	33
Vía de PI3K/AKT	33
Reguladores del linaje melanocítico.....	35
Reguladores de la apoptosis.....	38
1.2.2.7. Diagnóstico del melanoma.....	39
1.2.2.8. Estadificación del melanoma.....	41
1.2.2.9. Tratamiento del melanoma.....	42
Cirugía.....	42
Radioterapia	42
Inmunoterapia.....	43
Terapia dirigida contra dianas moleculares específicas	44
Quimioterapia.....	45
Perfusión aislada de las extremidades	46
1.3. FOLATOS Y ANTIFOLATOS.....	47
1.3.1. ÁCIDO FÓLICO	47
1.3.2. DIHIDROFOLATO REDUCTASA.....	48
1.3.2.1. Mecanismo de acción.....	49
1.3.2.2. Estructura de la DHFR.....	51
1.3.2.3. El centro activo de la DHFR y su movimiento durante el ciclo catalítico	52
1.3.2.4. El gen de la DHFR.....	53
1.3.3. METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO.....	53
1.3.4. ANTIFOLATOS	56
1.3.4.1. Aplicaciones clínicas de los antifolatos.....	57
1.3.4.2. Metotrexato	58
1.3.5. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS	60
1.3.5.1. Transportador de Folatos Reducidos	60
1.3.5.2. Receptores de Folato de alta afinidad.....	61
1.3.5.3. Transportador de Folato Acoplado a Protones	62
1.3.5.4. Exportación de antifolatos a través de proteínas de resistencia a multidrogas	63
1.3.6. LA POLIGLUTAMINACIÓN COMO MECANISMO DE RETENCIÓN CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS	63
1.4. RESISTENCIA DEL MELANOMA A LAS TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS.....	65
1.4.1. MECANISMOS CLÁSICOS DE RESISTENCIA A ANTIFOLATOS.....	65
1.4.1.1. Disminución de la captación de antifolatos por pérdida de función del RFC.....	66
1.4.1.2. Sobreexpresión de la DHFR y mutaciones que disminuyen su afinidad por antifolatos.....	67

1.4.1.3. Mecanismos de resistencia asociados a defectos en la poliglutaminación de los antifolatos	68
1.4.1.4. Aumento de de la expresión de las MRPs	68
1.4.1.5. Inactivación metabólica de los antifolatos	69
1.4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIFOLATOS ESPECÍFICOS DEL MELANOMA.....	69
1.4.2.1. Implicaciones de la expulsión de MTX sobre la división celular y el metabolismo del ácido fólico	70
1.4.2.2. Los melanosomas como mediadores de la resistencia del melanoma al MTX	71
1.4.2.3. El transporte de melanosomas y la resistencia al MTX	72
1.4.2.4. Implicación de la respuesta al daño en el ADN en la resistencia del melanoma	75
Vías de señalización de daño al ADN	75
Supresión de los <i>checkpoints</i> como estrategia terapéutica	78
UCN-01 como inhibidor de los puntos de control de daño al ADN	79
Otras dianas farmacológicas del UCN-01: PKC, CDKs y PDK1	80
Ensayos clínicos con UCN-01	81
1.5. NUEVOS ANTIFOLATOS DERIVADOS DE LAS CATEQUINAS DEL TÉ.....	82
1.5.1. EL TÉ: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES.....	82
1.5.2. LAS CATEQUINAS DEL TÉ COMO ANTIFOLATOS.....	83
1.5.3. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LAS CATEQUINAS: EL TMECG	85
1.5.3.1. El TMECG como una prodroga activada por tirosinasa en melanoma.....	85
1.5.3.2. Actividad del TMECG en líneas celulares y modelos animales de melanoma.....	87
1.5.3.3. Mecanismo de acción del TMECG en melanoma	88
CAPITULO 2. OBJETIVOS	91
2.1. OBJETIVO GENERAL.....	93
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	93
CAPITULO 3. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN	95
3.1. MODELOS EXPERIMENTALES.....	97
3.1.1. CULTIVOS CELULARES.....	97
3.1.1.1. Líneas celulares continuas.....	98
3.1.1.2. Líneas celulares con bajo número de pases	104
3.1.1.3. Cultivos primarios.....	105
Cultivos establecidos a partir de melanomas inoculados en ratón.....	105
Cultivos primarios obtenidos a partir de metástasis humanas	106
3.1.2. MODELOS ANIMALES	106

3.1.2.1. Ratones C57BL/6J	107
3.1.3. MODELOS DE PIEL HUMANA.....	108
3.1.3.1. Modelo de piel de melanoma humano	108
3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	110
3.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR	110
3.2.1.1. Ensayo con azul tripán.....	110
3.2.1.2. Ensayo con MTT.....	112
3.2.1.3. Ensayo con XTT	113
3.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS	114
3.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA	114
3.2.2.2. Análisis de apoptosis mediante ensayo con Anexina V.....	116
3.2.2.3. Análisis de la apoptosis mediante tinción de Hoechst	117
3.2.3. ENSAYOS DE INVASIVIDAD	118
3.2.4. MICROSCOPÍA	120
3.2.4.1. Microscopía óptica	120
Microscopía de contraste de fases.....	120
Microscopía de fluorescencia	121
Microscopía confocal.....	121
3.2.4.2. Microscopía electrónica	124
Microscopio electrónico de transmisión (MET).....	124
Microscopio electrónico de barrido (MEB)	125
3.2.5. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOFUORESCENCIA.....	126
3.2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO	129
3.2.6.1. Análisis del ciclo celular	131
3.3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA.....	132
3.3.1. ELECTROFORESIS.....	132
3.3.1.1. SDS-PAGE.....	132
3.3.2. WESTERN BLOT	137
3.3.3. CENTRIFUGACIÓN	140
3.3.3.1. Centrifugación diferencial	142
3.3.3.2. Centrifugación en gradiente de densidad	143
3.3.4. LIOFILIZACIÓN	145
3.3.5. DETERMINACIÓN DE FÓLICO TOTAL	146
3.3.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS	147
3.3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	149
3.3.8. CROMATOGRAFÍA	150

3.3.8.1. Cromatografía de exclusión molecular.....	151
3.3.8.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	152
3.3.9. CONJUGACIÓN DE MTX CON PEROXIDASA.....	153
3.3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PP2A.....	154
3.3.11. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE.....	156
3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	158
3.4.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	158
3.4.1.1. Extracción de ADN genómico.....	158
3.4.1.2. Extracción de ARN total.....	159
3.4.1.3. Extracción de ARNm.....	160
3.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN.....	161
3.4.3. ANALISIS DE LA CANTIDAD Y GRADO DE PUREZA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS.....	164
3.4.3.1. Cuantificación mediante espectrofotometría UV.....	164
3.4.3.2. Cuantificación mediante el uso de marcadores fluorescentes.....	165
3.4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	166
3.4.4.1. PCR convencional.....	167
3.4.4.2. PCR a tiempo real.....	168
3.4.5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA.....	172
3.4.6. ENSAYO COMETA.....	174
3.4.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA.....	175
3.4.8. ANÁLISIS DE DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS TRIFOSFATO.....	179
3.4.9. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN.....	180
3.5. ESTADÍSTICA.....	183
CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	185
4.1. EL MELANOMA COORDINA MECANISMOS GENERALES Y ESPECÍFICOS PARA PROMOVER LA RESISTENCIA AL METOTREXATO.....	187
4.2. MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES DE RESISTENCIA AL METOTREXATO EN MELANOMA.....	189
4.3. EL CAMBIO FENOTÍPICO DIRIGIDO COMO UNA ESTRATEGIA EFECTIVA CONTRA EL MELANOMA.....	191
4.4. SUPRESIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIFOLATOS MEDIANTE LA INTERVENCIÓN DE LA VÍA DE MIOSINA Va EN MELANOMA.....	193
4.5. COMO CONVERTIR LA RESISTENCIA EN EL TALÓN DE AQUILES DEL MELANOMA.....	195
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES.....	197

CAPÍTULO 6. RESUMEN.....201

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA.....207

ABREVIATURAS

α -MSH: *alpha melanocyte stimulating hormone*

18F-FDG: 2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa

7-OH-MTX: 7-hidroxi-metotrexato

A: absorbancia

ABC: *ATP-Binding Cassette*

ABTS: 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-sulfónico)

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNasa: desoxirribonucleasas

ADNc: ADN complementario o copia

ADNdc: ADN de doble cadena

ADNsc: ADN de cadena sencilla

Ago2: argonauta 2

AICAR: aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido

Akt: *v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog*

AMPc: adenosín monofosfato cíclico

AMT: aminopterina

AP-2: *activating enhancer binding protein 2*

APAF-1: *apoptosis-activating factor 1*

Arg: arginina

ARN: ácido ribonucleico

ARNasa: ribonucleasas

ARNdc: ARN de doble cadena

ARNi: ARN de interferencia o *siRNA (small interfering RNA)*

ARNm: ARN mensajero

ARNsc: ARN de cadena sencilla

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

ATCC: Colección Americana de Cultivo de Tejidos Tipo

ATM: *ataxia telangiectasia mutated*

ATP: adenosín trifosfato

ATR: *ataxia telangiectasia and Rad3 related*

ATRIP: *ATR interacting protein*

Bad: *Bcl-2 associated death protein*

Bak: *Bcl-2 homologous antagonist killer*

Bax: *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-2: *B-cell lymphoma 2*

Bcl-w: *Bcl-2-like protein w*

Bcl-XL: *B-cell lymphoma-extra large*

BCNU: carmustina

BCRP: *breast cancer resistance protein*

BH3: *Bcl-2 homology domain 3*

Bid: *Bcl-2 interacting domain*

Bik: *Bcl-2-interacting killer*

Bim: *Bcl-2-interacting mediator of cell death*

BRCA1: breast cancer 1

BRIT1: *BRCT-repeat inhibitor of hTERT expression*

BSA: albúmina de suero bovino (*bovin serum albumin*)

CCNU: lomustina

CD34: *cluster of differentiation 34*

CD4: *cluster of differentiation 4*

CD8: *cluster of differentiation 8*

CDBT: cisplatino, dacarbazina, carmustina y tamoxifeno

Cdc25A/B/C: cell division cycle 25A, B and C

Cdc45: *cell division control protein 45 homolog*

CDK1/2/4/6: quinasas dependientes de ciclinas 1, 2, 4 y 6 (*cyclin dependent kinases 1, 2, 4 and 6*)

CDKN2A: *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (gene)*

Células NK: células *natural killer*

c-FOS: *Finkel–Biskis–Jenkins murine osteosarcoma viral oncogene homolog*

CLSM: *Confocal Láser Scanning Microscopy*

CO₂: dióxido de carbono

Complejo 9-1-1: complejo constituido por las proteínas RAD9-Hus1-RAD1

Complejo MRN: complejo constituido por las proteínas MRE11-RAD50 y NBS1

CPDs: dimeros de pirimidina tipo ciclobutano

CREB: *cAMP response element-binding protein*

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*)

CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

CVD: cisplatino, vinblastina y dacarbazina

CHEK1: *checkpoint kinase 1 (gene)*

Chk1: *checkpoint kinase 1 (protein)*

Chk2: *checkpoint kinase 2 (protein)*

DAB: 3, 3'-diaminobenzidina

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

DCT: dopacromo tautomerasa

DHF: 7,8-dihidrofolato

DHFR: dihidrofolato reductasa

DMEM: *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: dimetil sulfóxido

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato

DR: *death receptor*

E2F: *E2 binding transcription factor*

ECACC: Colección Europea de Cultivos Celulares

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: *epidermal growth factor receptor*

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*)

EMT: transición epitelio-mesénquima

ERK1/2: *extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*

FANCD2: *Fanconi-associated nuclease 1*

FITC: isotiocianato de fluoresceína

FPGS : folilpoliglutamato sintetasa

FR - $\alpha/\beta/\gamma$: *Folate Receptor alpha, beta and gamma*

FSC: en citometría, medida de la dispersión frontal de la luz (*forward scatter*)

GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GAR: glicinamida ribonucleótido

GATA: *globin transcription factor 1*

GCMCC : Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares

GDP: guanosín difosfato

GEF: factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*guanine nucleotide exchange factor*)

Glu: ácido glutámico

GLUT1: *glucose transporter 1*

GLUT4: *glucose transporter 4*

Gly: glicina

GNAQ: *guanine nucleotide binding protein Q polypeptide*

GPI: glicosil fosfatidil inositol

GTC: tiocianato de guanidina

GTP: guanosín trifosfato

GTPasas: guanosín trifosfatasa

Hdm2: *human double minute 2*

HER2/neu: *human epidermal growth factor receptor*

HIF-1 α and HIF-2 α : *hypoxia-inducible factors 1 and 2 alpha*

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia (acrónimo del inglés *high performance liquid chromatography*)

HRP: peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase*)

Hus1: *checkpoint protein Hus1*

IHF: inmunohistofluorescencia

IHQ: inmunohistoquímica

IL: interleuquina

IRS: *insulin receptor substrate*

IVIS: *In Vivo Imaging System*

Lef1: *lymphoid enhancer-binding factor 1*

Leu: leucina

LRO: orgánulos relacionados con los lisosomas (*lysosome-related organelles*)

Lys: lisina

MAGE: *Melanoma-associated antigen*

MALDI: ionización por desorción láser asistida por una matriz (acrónimo del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*).

MAP2/4: *microtubule-associated proteins 2 and 4*

MAPK: *mitogen-activated protein kinases*

MART-1: *melanoma antigen recognized by T-cells 1*

MC1R: receptor de melanocortina 1

Mcl-1: *myeloid cell leukemia 1*

MDC1: *mediator of DNA damage checkpoint protein 1*

Mdm2: *mouse double minute 2*

MDM2: mouse double minute 2 (gene)

MEB: microscopía electrónica de barrido

MEK1/2: *MAPK/ERK kinases 1 and 2*

MEM: *Eagle's Minimum Essential Media*

Met: metionina

MET: microscopía electrónica de transmisión	NF-κB: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
MET: transición mesénquima-epitelio	NH₄: amoníaco
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad	NHDF: fibroblastos humanos normales de la dermis (<i>normal human dermal fibroblasts</i>)
MITF: <i>microphthalmia-associated transcription factor</i>	NHEK: queratinocitos humanos normales de la epidermis (<i>normal human epidermal keratinocytes</i>)
MLH1: <i>mutL homolog 1</i>	Noxa: <i>NADPH oxidase activator</i>
MLPH: <i>Melanophilin (gene)</i>	NY-ESO-1: <i>New York-esophageal cancer-1</i>
M-MLV RT: Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney	p14^{ARF}: <i>alternative reading frame p14</i>
MMP-9: <i>matrix metalloproteinase 9</i>	p16^{INK4a}: <i>inhibitor of kinase 4a p16</i>
MRE11: <i>meiotic recombination 11 homolog 1</i>	p21^{CIP1}: <i>CDK-interacting protein 1 p21</i>
MRI: imágenes por resonancia magnética	p27^{KIP1}: <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B p27</i>
MRP: <i>multidrug resistance proteins</i>	p53: <i>tumor protein p53</i>
MSH2: <i>mutS homolog 2</i>	p53BP1: <i>tumor suppressor p53-binding protein 1</i>
MSH6: <i>mutS homolog 6</i>	p73: <i>tumor protein p73</i>
MTT: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio	PAF: <i>platelet activating factor</i>
MTX: metotrexato	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
MYC: <i>avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog</i>	PARP: <i>Poly [ADP-ribose] polymerase</i>
MYO5A: <i>myosin Va (gene)</i>	PBS: tampón fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
MyoVa: <i>myosin Va (protein)</i>	PBT: PBS conteniendo un 0.05% (v/v) de Tween-20
MyRIP: <i>myosin VIIA and Rab interacting protein</i>	PCFT: <i>proton coupled folate transporter</i>
N⁵,N¹⁰-MTHFR : N ⁵ ,N ¹⁰ -metilen-THF reductasa	PCR: reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
NADP+: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma oxidada)	PD-1: <i>programmed cell death 1</i>
NADPH+: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (forma reducida)	
NBS1: <i>nucleotide-binding site protein 1</i>	

PK1/2: <i>phosphoinositide-dependent kinases 1 and 2</i>	Rab-27A: <i>RAS-associated GTP binding protein 27A(protein)</i>
PD-L1 /2: <i>programmed cell death ligand 1 and 2</i>	RAB3GEF: <i>Rab3 GDP-GTP exchange factor</i>
PET: tereftalato de poliestireno	RAD1: DNA repair protein RAD1
PET: tomografía por emisión de positrones	RAD50: <i>DNA repair protein RAD50</i>
PGE₂: prostaglandina E2	RAD51: <i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
Phe: fenilalanina	RAD6: <i>DNA repair protein RAD6</i>
PI3K: fosfatidilinositol 3-quinasa	RAD9: DNA repair protein RAD9
PIP₂: fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato	RAF: <i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
PIP₃: fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato	RAS: <i>rat sarcoma</i>
PMEL17: <i>melanocyte protein 17</i>	RB: retinoblastoma (proteína)
PML: <i>promyelocytic leukemia protein</i>	RB1: gen del retinoblastoma 1
PMS2: <i>postmeiotic segregation increased 1 (PMS1) homolog 2</i>	RFC: <i>reduced folate carrier</i>
POMC: proopiomelanocortina	RGP: fase de crecimiento radial (<i>radial growth phase</i>)
PS: fosfatidil serina	RISC: <i>RNA Induced Silencing Complex</i>
PTEN: <i>phosphatase and tensin homolog</i>	RPA: <i>replication protein A</i>
PUMA: <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>	rpm: revoluciones por minuto
PVDF: fluoruro de polivinilideno (<i>polyvinylidene difluoride</i>)	RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute
PYR : pirimetamina	RT: retrotranscripción o transcripción inversa
QM⁻: forma aniónica de la quinona metide	RTK: receptor tirosina quinasa
QM: quinona metide	SAM: S-adenosil metionina
QMH: forma protonada de la quinona metide	SBF: suero bovino fetal
qPCR: PCR cuantitativa (<i>quantitative polymerase chain reaction</i>)	SCT: sección de cultivo de tejidos
RAB27A: <i>RAS-associated GTP binding protein 27A (gene)</i>	SDS: dodecilsulfato sódico
	Ser: serina
	SH: <i>Src homology domain</i>
	SHD: <i>Slp homology domain</i>

SHMT: serina hidroximetil transferasa	Tm: temperatura de fusión (<i>melting temperature</i>)
SIDA: síndrome de inmunodeficiencia adquirida	TMECG: 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina
SlaC2-a/-b/-c: <i>synaptotagmin-like protein (Slp) lacking C2 domains-a, b and c</i>	TMP: trimetoprim
SLC19A1: <i>Solute Carrier Family 19 (Folate Transporter), Member 1</i>	TNF: <i>tumor necrosis factor</i>
Slp: <i>synaptotagmin-like protein</i>	TOF: analizador de tiempo de vuelo (acrónimo del inglés <i>Time Of Flight</i>)
Sp1: <i>specificity protein 1 transcription factor</i>	TopBP1: <i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
SSC: en citometría, medida de la dispersión ortogonal de la luz (<i>side scatter</i>)	TP53: <i>tumor protein p53 (gene)</i>
T: transmitancia	TP73: <i>tumor protein p73 (gene)</i>
TAA: antígenos asociados al tumor	Trp: triptófano
TAC: tomografía axial computarizada	TS: timidilato sintasa
TAE: TRIS-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.5	TSP-1: trombospodina 1
Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0	TT: tampón de transferencia
Tampón TE-T: Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0.5%, pH 8	TYR: tirosinasa (<i>tyrosinase</i>)
TAp73: <i>transactivating p73 isoform</i>	TYRP1: proteína relacionada con tirosinasa 1 (<i>tyrosinase-related protein</i>)
TBS-T: tampón tris salino conteniendo tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline and Tween 20</i>)	UCN-01: 7-hidroxi-estaurosporina
TCR: <i>T-cell receptor</i>	USF-1: <i>upstream transcription factor 1</i>
TEMED: N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamina	UV: radiación ultravioleta
TFA: ácido trifluoroacético	Val: valina
TGF-β: <i>transforming growth factor beta</i>	VEGF-A: <i>vascular endothelial growth factor A</i>
THF: 5,6,7,8-tetrahidrofolato	VEGFR: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>
Thr: treonina	VGP: fase de crecimiento vertical (<i>vertical growth phase</i>)
TIL: linfocitos T infiltrantes del tumor	VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

Wnt: *Drosophila wingless and vertebrate integrated-1 homolog*

XTT: 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida

Δ Np73: *N-terminal truncated p73 isoform*



CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

*Darí­a todo lo que sé por la mitad de
lo que ignoro.*

René Descartes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CÁNCER

1.1.1. CONCEPTOS GENERALES

El origen de la palabra cáncer se atribuye al médico griego Hipócrates (460-370 a.C.), considerado el padre de la medicina, quien utilizó la palabra griega *karkinos*, que en griego significa cangrejo, para referirse a esta enfermedad por homología entre las proyecciones con forma de dedos que emergen de un tumor infiltrante y la forma de un cangrejo.

Hoy en día sabemos que el término cáncer no hace referencia a una única enfermedad, sino a un grupo constituido por más de 100 enfermedades diferentes que afectan a distintos tejidos pero que tienen un denominador común: se originan por un crecimiento incontrolado de las células que adquieren, además, la capacidad de invadir el tejido sano adyacente, así como de diseminarse a otras partes del organismo.

La capacidad de división celular es esencial durante el desarrollo embrionario y durante el crecimiento del organismo, pero también permite el mantenimiento de los tejidos a lo largo de toda la vida del individuo. En condiciones normales, existen estrictos mecanismos de control que mantienen un equilibrio entre los procesos de división celular y los procesos de muerte celular (generalmente por apoptosis) para asegurar la integridad de los tejidos y órganos. Sin embargo, determinadas mutaciones en el ADN o alteraciones epigenéticas pueden dar lugar a la ruptura de este equilibrio entre división y muerte celular, permitiendo una proliferación anormal que da lugar a una masa de células denominada tumor. De esta forma, se inicia el proceso de desarrollo del cáncer o carcinogénesis que normalmente es un proceso progresivo.

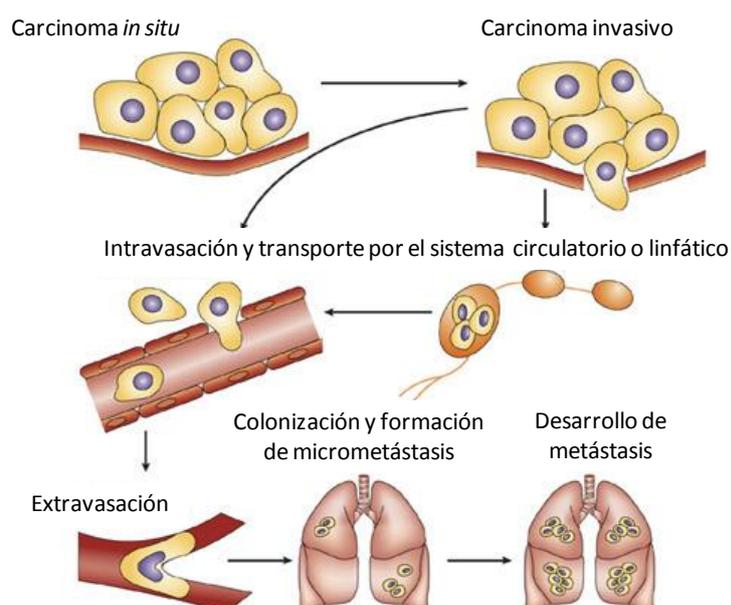


Figura 1.1. Etapas de los procesos de carcinogénesis y metástasis.

Este proceso comienza con la formación de un tumor benigno o carcinoma *in situ* que es una lesión temprana, generalmente de pequeño tamaño, confinada a la localización inicial que no tiene capacidad de invadir el tejido normal circundante ni de diseminarse hacia otras partes del cuerpo y cuya resección normalmente supone la cura del paciente. Cuando estas lesiones benignas no se detectan, pueden progresar y convertirse en tumores malignos que, además de aumentar su tamaño, adquieren la capacidad de invadir el tejido sano adyacente y de diseminarse a otras partes del organismo a través del sistema circulatorio o linfático. A estos tumores secundarios originados en lugares distantes por diseminación del tumor inicial (tumor primario) se les denomina metástasis. Por definición, el término cáncer se aplica solamente a los tumores malignos (Figura 1.1).

1.1.2. GENÉTICA DEL CÁNCER

En las últimas décadas, se han descubierto múltiples genes implicados en el desarrollo de los diversos tipos de cáncer, así como las alteraciones genéticas que sufren y las rutas moleculares a través de las cuales actúan. Así, hoy en día se afirma que “el cáncer es una enfermedad de los genes”. Clásicamente, los genes implicados en el desarrollo del cáncer o “genes del cáncer” se han agrupado en dos tipos: oncogenes y genes supresores de tumores.

Por una parte, los **oncogenes** son genes que se originan por alteración de genes normales, denominados protooncogenes, que son genes implicados en el crecimiento y la proliferación celular. Las alteraciones que dan lugar a los oncogenes son mutaciones activadoras que hacen que la proteína se active de forma constitutiva o en condiciones en las que la proteína silvestre se encuentra inactiva. Entre estas mutaciones se encuentran translocaciones, amplificaciones génicas y mutaciones puntuales en residuos esenciales para la regulación de la actividad de la proteína. Normalmente, estas mutaciones son dominantes y la mutación en un alelo es suficiente para conferir una ventaja selectiva de crecimiento a la célula.

Por otra parte, los **genes supresores de tumores** son genes que normalmente inhiben la proliferación celular o promueven la apoptosis, de manera que su inactivación contribuye al desarrollo tumoral. Las alteraciones genéticas que producen su inactivación suelen ser mutaciones que reducen o anulan su funcionamiento, como las “mutaciones de cambio de sentido” en residuos clave para su actividad, las “mutaciones sin sentido” que dan lugar a una proteína trunca, o las deleciones e inserciones. A diferencia de los oncogenes, en la mayoría de los casos, las mutaciones en los genes supresores de tumores son de carácter recesivo, es decir, es necesaria la pérdida de los dos alelos para que se manifieste el efecto. Sin embargo, en algunos casos existe haploinsuficiencia, es decir, un solo alelo no es suficiente para cumplir la función supresora y su inactivación confiere una ventaja selectiva a la célula afectada. Además de estos dos tipos de genes existiría una tercera categoría de “genes del cáncer”, los denominados **genes de reparación del ADN**, cuya función sería la de mantener la integridad del genoma de forma que su alteración favorece la acumulación de mutaciones.

A pesar de ser una enfermedad genética, la alteración de un único gen no causa cáncer gracias a que las células poseen múltiples mecanismos protectores, de manera que es necesaria la alteración de varios genes para el desarrollo de cáncer. La activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores tumorales hacen que la balanza que determina el destino celular se incline hacia la

proliferación, en lugar de hacia la inhibición del crecimiento o la apoptosis, lo que conlleva a la desregulación de la proliferación y a la tumorigénesis (Figura 1.2).

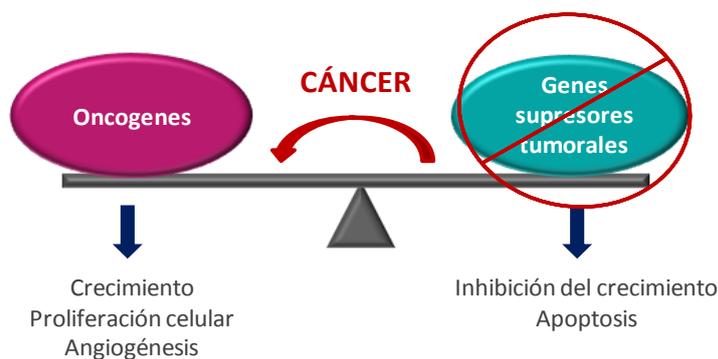


Figura 1.2. Modelo de desarrollo del cáncer como consecuencia de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumores.

Además de mediante mutaciones, los protooncogenes y los genes supresores de tumores pueden ser activados o inactivados mediante **modificaciones epigenéticas**. Se trata de modificaciones químicas que sufren el ADN o las histonas que determinan el grado de empaquetamiento de la cromatina y, por tanto, determinan la accesibilidad de la maquinaria responsable de la transcripción al ADN. Así, estos cambios pueden dar lugar a la activación de la expresión de oncogenes o bien a la inactivación de la expresión de genes supresores de tumores o de genes de reparación. Tanto los cambios genéticos como los epigenéticos ejercen una influencia mutua, es decir, existen mutaciones que dan lugar a cambios epigenéticos y cambios epigenéticos que favorecen la acumulación de mutaciones, de manera que ambos tipos de modificaciones contribuyen a la adquisición progresiva de las características de las células cancerígenas.

En las últimas décadas, se ha secuenciado el genoma de una amplia variedad de tumores humanos, lo cual ha proporcionado una valiosa información sobre las mutaciones presentes en distintos tipos de cáncer. En las células cancerosas existe un elevadísimo número de alteraciones genéticas. Pero de éstas, tan solo un reducido número de mutaciones afectan a estos “genes del cáncer”. A estas mutaciones se denominan **mutaciones driver o conductoras** y se trata de mutaciones que provocan una alteración de los mecanismos de control de la proliferación, la diferenciación y la muerte celular, así como las interacciones homeostáticas con el microambiente tisular. De esta manera, las mutaciones *driver* confieren una ventaja de crecimiento al clon neoplásico, permitiéndole expandirse más que las células normales, invadir el tejido circundante y, en muchos casos, metastatizar. Por el contrario las **mutaciones passenger o pasajeras** aparecen en gran número en la mayoría de los tumores y, por definición, no confieren una ventaja selectiva a la célula. Algunas de estas mutaciones pasajeras podrían estar presentes en la célula incluso antes de la iniciación del tumor, pero muchas otras se acumulan aleatoriamente como consecuencia de la alta tasa de replicación y de la alteración de los mecanismos de reparación del ADN que presentan las células tumorales. El estudio de las mutaciones *driver* en los distintos tipos de cáncer es una herramienta clave para el desarrollo de terapias dirigidas contra dianas moleculares esenciales para la célula tumoral.

El 90-95% de los individuos que desarrolla un cáncer lo hace de forma esporádica, es decir, no existe ningún factor hereditario que aumente la probabilidad de padecer la enfermedad. En estos

casos la enfermedad suele aparecer a una edad avanzada y, generalmente, como consecuencia de la acumulación gradual de las mutaciones somáticas ocurridas desde el estado de embrión hasta la edad adulta del individuo. Existe, en cambio, un pequeño porcentaje de pacientes (entre un 5 y un 10%) en los que la aparición del cáncer guarda una estrecha relación con la presencia de mutaciones germinales que determinan un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de cáncer. Se habla entonces de cáncer hereditario, en el que el individuo tiene una probabilidad mucho mayor que la población general para desarrollar cáncer y, generalmente, este cáncer aparece a edades tempranas.

1.1.3. LOS RASGOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER

Como se ha comentado anteriormente, la secuenciación del genoma humano ha desvelado que los distintos tipos de cáncer presentan un elevado número de alteraciones genéticas diferentes. Sin embargo, en el año 2000, Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg postularon que esta inmensa y diversa colección de alteraciones genéticas asociadas a los distintos tipos de cáncer podría ser el reflejo de alteraciones en un reducido grupo de circuitos reguladores que estarían alterados, de uno u otro modo, en los distintos tipos de tumores. Así, sugirieron que el amplio catálogo de genotipos de las células cancerígenas sería una manifestación de **seis alteraciones esenciales en la fisiología celular** que, de forma colectiva, determinarían el crecimiento maligno. Estas seis alteraciones serían: autosuficiencia de señales de crecimiento, insensibilidad a las señales de inhibición del crecimiento, evasión de la muerte celular programada (apoptosis), potencial replicativo ilimitado, angiogénesis sostenida e invasión tisular y metástasis (Figura 1.3). Estos cambios fisiológicos constituirían capacidades que se irían adquiriendo durante el desarrollo tumoral como consecuencia de la ruptura de los mecanismos de defensa anticancerígena de las células y tejidos, y serían comunes a la mayoría de tumores humanos.

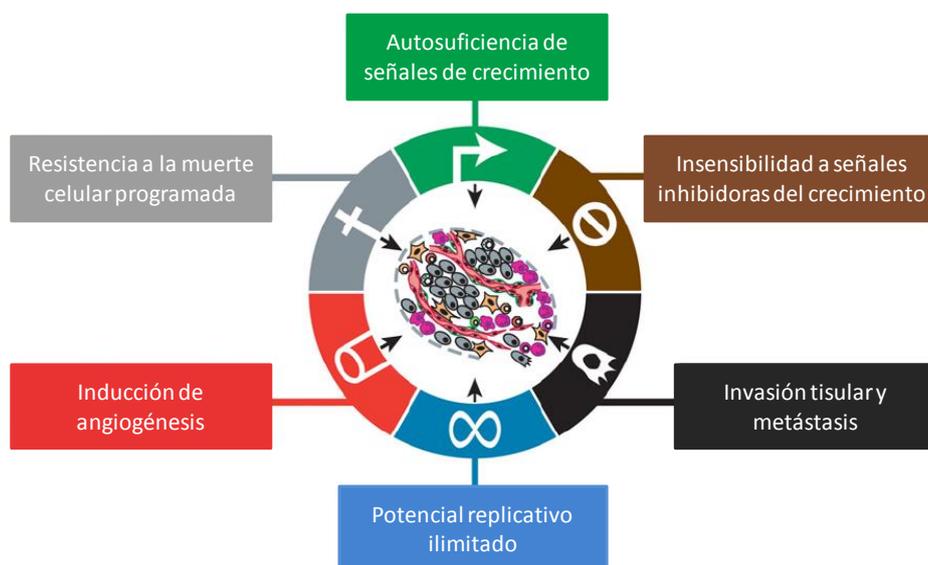


Figura 1.3. Esquema de los rasgos distintivos del cáncer según el modelo de Hanahan y Weinberg del año 2000.

En el año 2011, estos mismos autores publicaron una revisión de estos “rasgos del cáncer” en la que, además de redefinir y actualizar estas características, añadieron la inestabilidad genómica y la mutación, como fuente de la diversidad de alteraciones genéticas que facilita la adquisición de dichas

características; y la inflamación, como promotora del desarrollo de las mismas. Así mismo, añadieron dos características emergentes, de las células cancerígenas: la reprogramación del metabolismo energético y la evasión del sistema inmune (Figura 1.4). Por último, resaltaron el papel del microambiente tumoral en la adquisición de dichas características distintivas del cáncer (Hanahan y Weinberg, 2011).

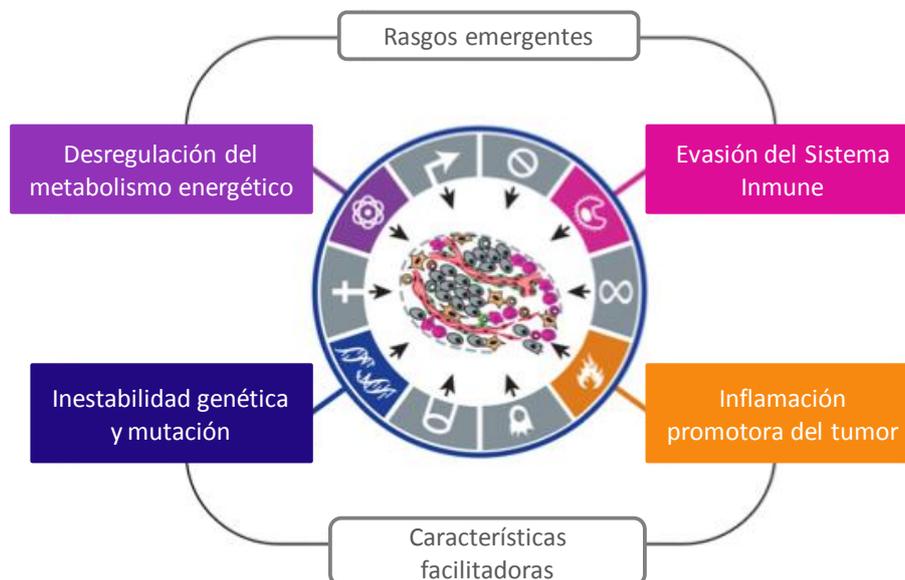


Figura 1.4. Los rasgos distintivos del cáncer originales, junto con los rasgos emergentes y las características facilitadoras de la adquisición de los mismos según la revisión de Hanahan y Weinberg del año 2011.

A continuación se describen con detalle estos rasgos de las células cancerígenas:

1.1.3.1. Mantenimiento de la señalización proliferativa

La característica fundamental de las células cancerígenas es su capacidad de mantener una proliferación crónica. Los tejidos normales tienen un control estricto de la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento que determinan tanto la entrada como la progresión a través del ciclo de crecimiento y división celular, asegurando la homeostasis del número de células y, por tanto, el mantenimiento de la arquitectura y función del tejido normal. Sin embargo, las células tumorales se convierten en dueñas de su propio destino mediante la desregulación de estas señales. Esta señalización es transmitida en gran medida por factores de crecimiento que se unen a receptores de la superficie celular, que suelen ser receptores con actividad tirosina quinasa, que emiten señales a través de vías de señalización intracelular que regulan el crecimiento y la progresión a través del ciclo celular, pero también influyen en otras propiedades biológicas como la supervivencia y el metabolismo energético. Las células cancerígenas pueden adquirir la capacidad de mantener la señalización proliferativa de diversas formas. En algunos casos, las propias células cancerígenas producen factores de crecimiento a los cuales pueden responder mediante la expresión de los correspondientes receptores (estimulación proliferativa autocrina) o, alternativamente, estas células pueden enviar señales que estimulan a las células normales del estroma tumoral a producir factores de crecimiento. En muchos cánceres se produce además una sobreexpresión de receptores en la membrana, haciendo a las células hipersensibles a cantidades de factores de crecimiento que normalmente no desencadenarían proliferación celular. Un claro ejemplo de ello es el receptor

HER2/neu que está sobreexpresado en muchos cánceres de mama (Slamon *et al.*, 1987). Además, estos receptores pueden sufrir alteraciones estructurales que facilitan la señalización independiente de ligando como, por ejemplo, versiones truncadas de EGFR que han perdido una parte de su dominio intracelular y señalizan constitutivamente. Pero esta independencia de factores de crecimiento puede derivarse también de la activación constitutiva de componentes de las vías de señalización situados aguas abajo de estos receptores. Por ejemplo, un elevado porcentaje de los melanomas humanos contienen mutaciones activadoras en la proteína BRAF que dan lugar a una señalización constitutiva hacia la vía de las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) (Davies y Samuels, 2010). De la misma manera, mutaciones en la subunidad catalítica de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) conducen a la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt (Jiang y Liu, 2009; Yuan y Cantley, 2008) (Figura 1.5).

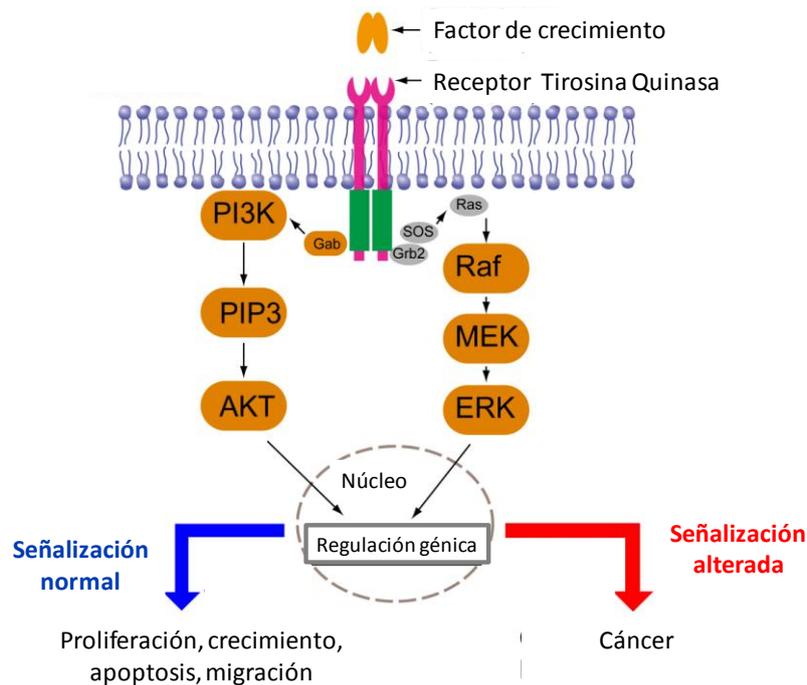


Figura 1.5. Principales vías de señalización proliferativa a partir de receptores tirosina quinasa.

Las células tumorales también pueden aumentar la señalización proliferativa mediante la disrupción de los mecanismos de retroalimentación negativa que normalmente atenúan la señalización proliferativa y aseguran una regulación homeostática de la señalización intracelular. El ejemplo más conocido son las mutaciones oncogénicas que afectan a los genes RAS. Las proteínas RAS son GTPasas de pequeño tamaño localizadas en la cara interna de la membrana plasmática, donde están ciclando continuamente entre el estado activo (complejo RAS-GTP) y el estado inactivo (complejo RAS-GDP). Las mutaciones activadoras de RAS impiden que su actividad GTPasa intrínseca funcione correctamente hidrolizando el GTP a GDP, lo que conlleva una permanente activación de la proteína. Otro ejemplo lo constituye la proteína fosfatasa PTEN que contrarresta el efecto de PI3K degradando su producto, el fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato (PIP₃). La inactivación de PTEN hace que la vía de señalización de PI3K/Akt no se pueda “apagar” adecuadamente, favoreciendo la tumorigénesis (Jiang y Liu, 2009; Yuan y Cantley, 2008).

Diversos autores han demostrado que la señalización celular excesiva por parte de oncoproteínas como RAS, MYC y RAF provoca la inducción de los procesos de senescencia celular y/o apoptosis como mecanismo de defensa (Collado y Serrano, 2010; Evan y d'Adda di Fagagna, 2009; Lowe *et al.*, 2004). En consecuencia, las células tumorales muestran una intensidad de señalización oncogénica que representa un compromiso entre la máxima estimulación mitogénica y la evasión de estas defensas antiproliferativas, o bien se adaptan a estos elevados niveles de señalización oncogénica deshabilitando los circuitos de inducción de la senescencia o de la apoptosis (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.3.2. Evasión de las señales supresoras del crecimiento

Además de inducir y mantener señales estimuladoras del crecimiento y la proliferación, las células cancerígenas tienen que burlar poderosos programas que regulan negativamente la proliferación celular. Muchos de estos programas dependen de la acción de genes supresores de tumores que son inactivados, de una u otra forma, en los distintos tipos de cáncer. Los dos genes supresores de tumores más importantes codifican para las proteínas RB (asociada al retinoblastoma) y p53, que constituyen los nodos centrales de dos circuitos supresores tumorales que gobiernan las decisiones de la célula de proliferar o, alternativamente, activar los programas de senescencia y apoptosis. Adicionalmente, numerosos estudios indican que p73, un miembro de la familia de p53, también juega un papel esencial en la supresión tumoral independientemente de p53 (Stiewe *et al.*, 2000; Irwin *et al.*, 2000).

Vía supresora tumoral de RB

La proteína RB integra principalmente señales extracelulares, pero también intracelulares y, en respuesta, decide si la célula debe proceder o no al ciclo de crecimiento y división celular (Burkhart y Sage, 2008; Deshpande *et al.*, 2005). En células quiescentes, RB bloquea la proliferación mediante su unión a los factores de transcripción E2F cuya función es inducir la expresión de genes esenciales para la progresión de fase G1 a S (Weinberg, 1995). Sin embargo, la señalización estimuladora del crecimiento, induce la expresión de ciclinas y activa a las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, acrónimo del inglés *cyclin dependent kinases*) que inactivan a la proteína RB mediante fosforilación. En concreto, a mitad de la fase G1 son los complejos ciclina D/CDK4 y ciclina D/CDK6 los que inician la fosforilación de RB, la cual culmina en la fase G1 tardía con la fosforilación por parte de los complejos ciclina E/CDK2. Esta fosforilación libera a E2F de RB y le permite inducir la expresión de los genes necesarios para la fase S. Por el contrario, la señalización supresora del crecimiento y el daño al ADN inducen la expresión de inhibidores de CDKs que mantienen a RB en su forma hipofosforilada y unida a E2F, por lo que estos inhibidores suponen un freno a la proliferación (Figura 1.6). Este punto de control determina la decisión de una célula de dividirse o no, por lo que la disrupción de esta vía supondría un evento crucial en la tumorigénesis.

En los tumores es frecuente la disrupción de la vía de RB, lo que libera a los factores de transcripción E2F y convierte a las células en insensibles a las señales que normalmente bloquean la entrada en el ciclo celular, permitiendo la proliferación celular persistente. De hecho, el 30% de los tumores presentan deleciones o mutaciones en el gen *RB1*. Además, son frecuentes las alteraciones en elementos situados aguas arriba de RB, como por ejemplo la sobreexpresión de la ciclina D o la disfunción de inhibidores de CDK como p16^{INK4a} (Sherr y McCormick, 2002). La disrupción de la vía de RB refuerza el arresto del ciclo celular mediado por p21^{CIP1} a través de la vía de p53. Pero cuando las

células fallan también en inducir el arresto del ciclo celular, se desencadena apoptosis a través de la vía de p53 o p73, como se explica a continuación.

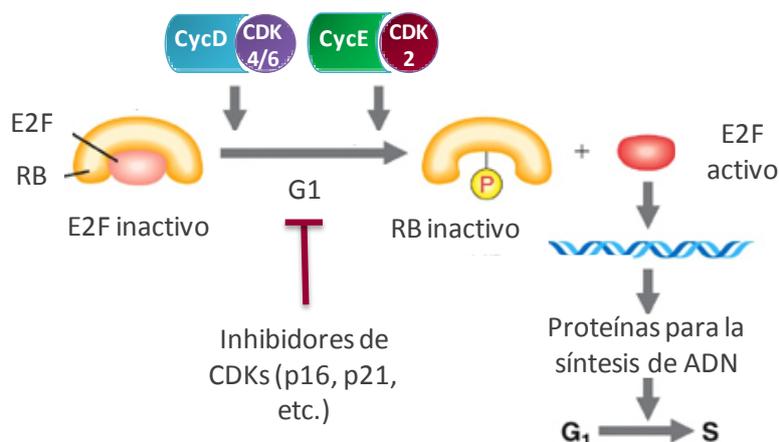


Figura 1.6. Vía supresora de tumores de RB.

Vía supresora tumoral de p53

Mientras que RB transduce señales inhibitorias del crecimiento que, en gran parte, se originan fuera de la célula, p53 recibe las señales de sensores intracelulares. Si la señalización oncogénica o el nivel de daño en el ADN son excesivos, o si los niveles de nucleótidos, glucosa, oxigenación o señales estimuladoras del crecimiento son subóptimos, p53 puede interrumpir la progresión en el ciclo celular hasta que estas condiciones se hayan normalizado. Alternativamente, si las señales de alarma indican daño irreparable en el genoma o graves alteraciones en estos sistemas, p53 puede desencadenar apoptosis. El arresto del ciclo celular está mediado por p21^{CIP1} cuya expresión es inducida por p53 y actúa inhibiendo a un amplio rango de CDKs. La apoptosis dependiente de p53 está mediada principalmente por la inducción de la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 (como PUMA, Noxa y Bax) que desestabilizan la membrana mitocondrial para facilitar la liberación del citocromo c que desencadena la cascada apoptótica. Así, los efectos de p53 son complejos y muy dependientes del contexto celular, variando en función del tipo celular y de la severidad y persistencia de las condiciones de estrés y daño genómico (Hanahan y Weinberg, 2011).

En condiciones normales, los niveles de expresión de p53 se mantienen bajos debido a que esta proteína es marcada para su degradación por el proteosoma mediante ubiquitinación mediada por la ubiquitina ligasa Mdm2 (acrónimo del inglés *mouse double minute 2*; Hdm2 en humanos) (Haupt *et al.*, 1997). Además, Mdm2 inhibe la traducción del ARNm de p53 (Ofir-Rosenfeld *et al.*, 2008). El gen *MDM2* es una diana transcripcional de p53, lo que supone un bucle de retroalimentación negativa que permite apagar la señalización a través de esta vía, devolviendo a p53 a sus niveles normales, una vez finalizada su actuación (Barak *et al.*, 1994).

Existen múltiples estímulos que desencadenan la estabilización y acumulación de p53. Por ejemplo, ante una estimulación oncogénica excesiva, la proteína p14^{ARF} se une a Mdm2 y lo secuestra en el nucléolo, lo que permite la estabilización de p53 y la expresión de sus genes diana. Cabe destacar que p14^{ARF} es una diana transcripcional de E2F, por lo que esta interacción supone una conexión entre ambas vías que asegura una eficiente respuesta supresora tumoral. Cuando se

produce la interrupción de la vía de RB, la actividad excesiva de E2F conduce a la expresión de p14^{ARF}, lo que conduce a la activación de la vía de p53 que inhibe el crecimiento celular oncogénico mediante el arresto del ciclo celular o la inducción de apoptosis (Bates *et al.*, 1998). Por tanto, la interrupción de ambas vías conllevaría a una fuerte inclinación de la balanza del destino celular hacia la proliferación y se cree que es esencial en el proceso tumorigénico. Otro estímulo importante que desencadena la activación de la vía de p53 es el daño al ADN, pero este mecanismo será discutido en detalle en el apartado 1.4.2.4 de esta memoria (Figura 1.7). Aproximadamente el 50 % de los tumores portan mutaciones en el gen *TP53* y, en aquellos tumores con baja frecuencia de mutaciones en *TP53*, esta vía es inactivada por otros mecanismos, como por ejemplo la sobreexpresión de Mdm2 (Soussi y Wiman, 2007; Polager *et al.*, 2009).

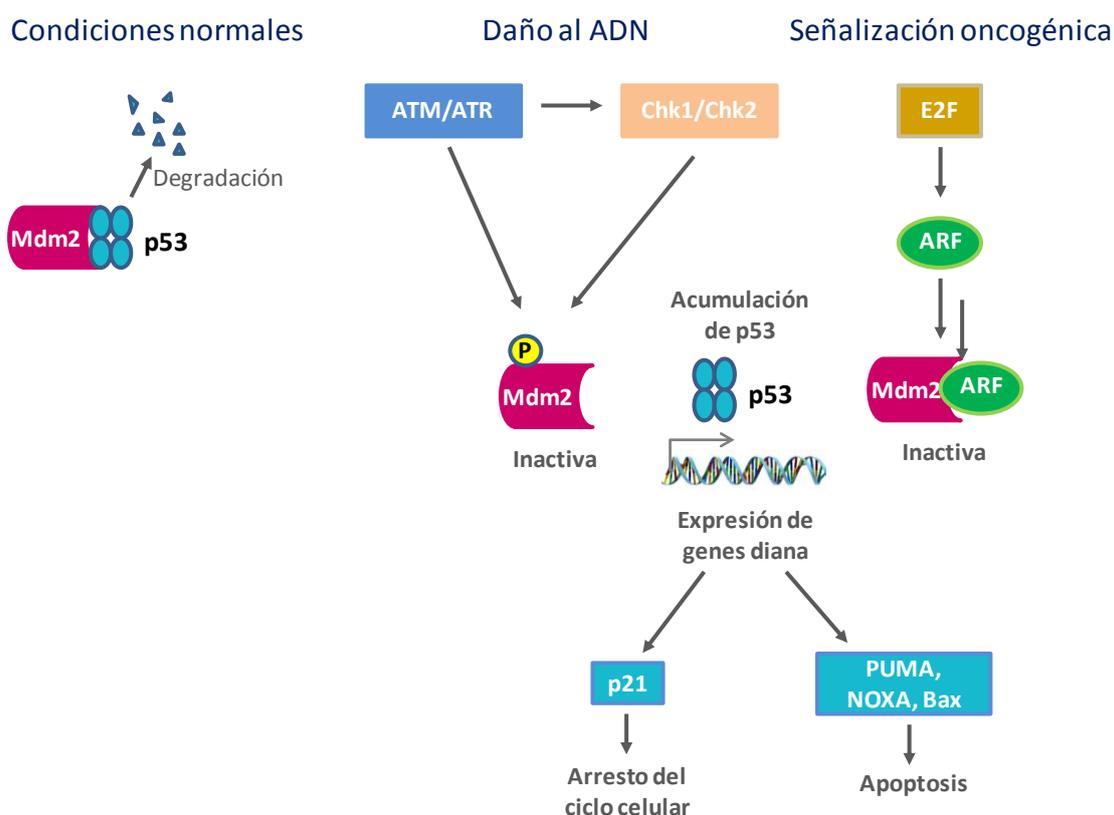


Figura 1.7. Vía supresora de tumores de p53 y su activación mediante el daño al ADN y la señalización oncogénica.

Vía supresora tumoral de p73

El gen *TP73*, codifica para dos isoformas TAp73 y Δ Np73 que son transcritas a partir de distintos promotores. La isoforma TAp73 presenta una alta homología con p53 y es capaz de activar el programa apoptótico de forma independiente de éste. Sin embargo, la isoforma Δ Np73 carece del dominio de transactivación y se une a p53 y TAp73 contrarrestando su actuación, por lo que tiene una función antiapoptótica. Así, el balance entre los niveles de TAp73 y Δ Np73 regula la sensibilidad celular a la apoptosis. Por ejemplo, en condiciones normales, la isoforma Δ Np73 es rápidamente degradada cuando se produce daño al ADN, mientras que los niveles de p53 y de TAp73 aumentan, lo que favorece la inducción de apoptosis (Ramadan *et al.*, 2005).

De forma similar a p53, TAp73 se activa ante la estimulación oncogénica o el daño al ADN (Zaika *et al.*, 2001; Flores *et al.*, 2002). Del mismo modo que p53, TAp73 se activa ante la activación excesiva de E2F que puede producirse por una señalización oncogénica o ante la disrupción de la vía de RB (Irwin *et al.*, 2000). Sus genes diana solapan parcialmente con los genes diana de p53. Por ejemplo, TAp73 induce la expresión de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl2 como Bax y PUMA (Melino *et al.*, 2004). TAp73 puede inducir apoptosis en ausencia de p53, por lo que parece que TAp73 sería como una copia de seguridad de la función supresora de p53 (Irwin *et al.*, 2000; Stiewe *et al.*, 2000). Las mutaciones en este gen son muy poco frecuentes (presentes en menos del 0.5% de los tumores), en comparación con las mutaciones en p53 (presentes en más del 50%) (Ramadan *et al.*, 2005). Solamente en algunos cánceres se ha visto sobreexpresión de la isoforma Δ Np73 o bien delección o silenciamiento génico del gen TP73 (Kaghad *et al.*, 1997; Esteller *et al.*, 2001; Moll y Slade, 2004).

1.1.3.3. Resistencia a la muerte celular

Diversos estudios han establecido que la muerte celular programada por apoptosis constituye una barrera natural al desarrollo de cáncer. La maquinaria apoptótica se compone de elementos reguladores y efectores (Adams y Cory, 2007). Los reguladores, a su vez, se dividen en dos circuitos principales. Por un lado, la vía extrínseca, que recibe y procesa las señales inductoras de muerte extracelulares como por ejemplo las que vienen de la unión de los receptores de muerte (generalmente de la familia del TNF, como TNF, DR4/5 y Fas) a sus ligandos. Por otro, la vía intrínseca que detecta e integra las señales de origen intracelular, como por ejemplo una elevada señalización oncogénica o el daño al ADN. Estas dos vías culminan con la activación de una caspasa iniciadora (caspasa 8 y caspasa 9, respectivamente), que inicia la cascada proteolítica mediada por las caspasas efectoras responsables de la ejecución de la apoptosis (Figura 1.8). Actualmente, se considera que el programa intrínseco de apoptosis es el más ampliamente implicado como barrera frente al desarrollo del cáncer.

El “gatillo de la apoptosis” que permite la transmisión de señales entre los reguladores y efectores de la cascada apoptótica está controlado por los miembros de la familia de proteínas reguladoras Bcl-2 (Adams y Cory, 2007). Esta familia consta de más de 20 miembros con funciones antiapoptóticas y proapoptóticas que se caracterizan por la presencia de, al menos, uno de los cuatro dominios de homología Bcl-2 (dominios BH 1-4). El prototipo, Bcl-2, y las proteínas relacionadas Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 y A1 actúan como inhibidores de la apoptosis debido a que se unen a miembros proapoptóticos de esta familia, como Bax y Bak, y los bloquean. Estos miembros proapoptóticos se encuentran embebidos en la membrana mitocondrial externa y, en ausencia de inhibición por parte de los miembros antiapoptóticos, generan poros que provocan la disrupción de dicha membrana dando lugar a la salida de proteínas de señalización proapoptótica como el citocromo c, que conduce a la formación del apoptosoma, un complejo multiproteico compuesto por siete copias de la proteína adaptadora APAF-1 (acrónimo del inglés *apoptosis-activating factor*), citocromo c y ATP. Este complejo permite la unión y la activación de la caspasa 9 que inicia la cascada de caspasas que, mediante su acción proteolítica, ejecutan el programa apoptótico (Figura 1.8).

Además, existe otra subfamilia de proteínas proapoptóticas que comparten con las anteriores únicamente el dominio BH3 que media la interacción proteína-proteína entre los distintos miembros de esta familia. Entre estos miembros *BH3-only* se encuentran las proteínas Bad, Bim, Bid, Noxa,

PUMA y Bik, y promueven la apoptosis bien uniéndose y bloqueando directamente a los miembros antiapoptóticos o bien estimulando a los miembros proapoptóticos. Estas proteínas *BH3-only* están acopladas con varios sensores de anomalía celular de forma que, en respuesta a señales apoptóticas, se activan por diversos mecanismos (transcripcionales, postranscripcionales y postraduccionales). Un ejemplo de estos sensores es *TP53* que, en respuesta al daño al ADN, induce apoptosis activando la expresión de las proteínas *BH3 only* Noxa y PUMA (Adams y Cory, 2007; Willis y Adams, 2005).

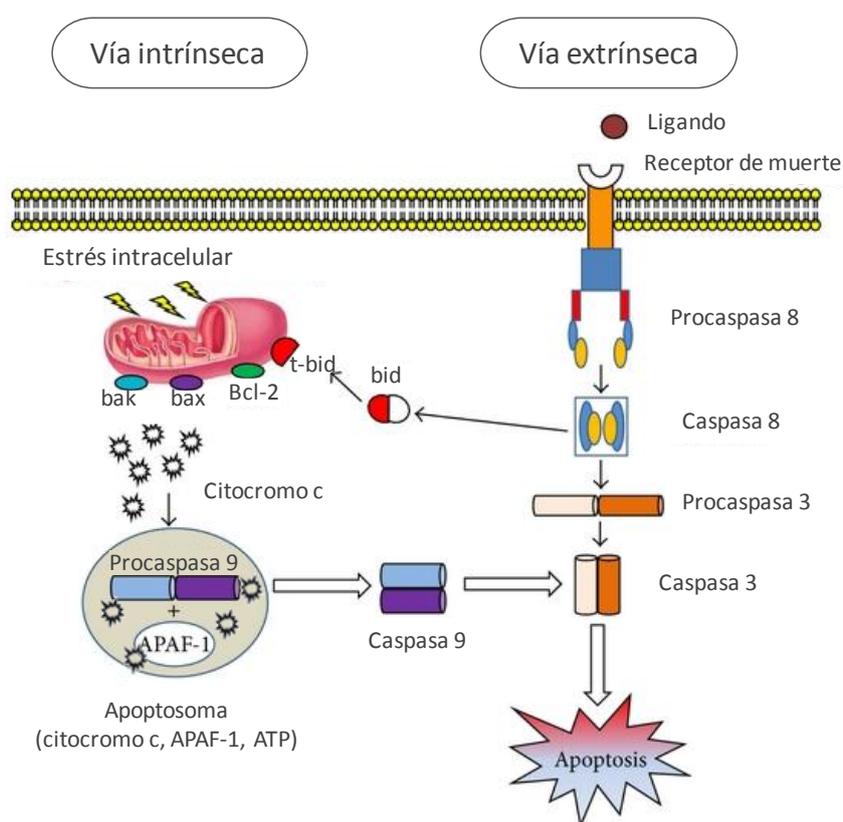


Figura 1.8. Esquema de la activación de las vías intrínseca y extrínseca de la apoptosis.

Las células tumorales desarrollan una variedad de estrategias para eludir la apoptosis. La más común es la pérdida de la función supresora de *p53*, de manera que se elimina el sensor crítico de daño en el ADN del circuito de inducción de apoptosis. De forma alternativa, los tumores incrementan la expresión de miembros antiapoptóticos de la familia *Bcl-2* o bien disminuyen la expresión de miembros proapoptóticos.

1.1.3.4. Potencial replicativo ilimitado

Los trabajos de Hayflick demostraron que las células en cultivo tienen un potencial replicativo finito, ya que tras un cierto número de divisiones detienen su crecimiento (Hayflick, 1997). Esto se debe a que las células de mamífero presentan un programa autónomo que limita su multiplicación denominado senescencia. Sin embargo, la inactivación de las proteínas supresoras de tumores *RB* y *p53*, permite a las células continuar multiplicándose durante unas cuantas generaciones adicionales hasta que entran en un segundo estado denominado crisis. Este estado se caracteriza por una muerte celular masiva, un desorden cariotípico asociado con fusiones cromosómicas y la emergencia

ocasional (1 en 10^7) de una célula que ha adquirido la capacidad de multiplicarse de forma ilimitada, proceso que se denomina inmortalización (Wright *et al.*, 1989).

El dispositivo temporizador que determina el número de divisiones celulares que una célula puede realizar se descubrió entre los años 80-90 y reside en los telómeros de los cromosomas. Estos telómeros constituyen la parte final que protege los cromosomas y está compuesta por una secuencia corta de 6 pares de bases que se repite cientos de veces. En cada ciclo de división celular los telómeros de cada cromosoma se acortan en unos 50-100 pares de bases debido a la incapacidad de las ADN polimerasas de replicar los extremos 3' de los cromosomas durante la fase S. De esta manera, el número de divisiones celulares se mide por la progresiva pérdida del ADN telomérico. Finalmente, la progresiva erosión de los telómeros a lo largo de los sucesivos ciclos de replicación hace que pierdan su capacidad de proteger el ADN cromosómico de fusiones cromosómicas, lo que resulta en desórdenes cariotípicos que provocan la crisis celular.

Sin embargo, las células malignas presentan un mantenimiento de los telómeros principalmente debido a la sobreexpresión de la enzima telomerasa que añade repeticiones del hexanucleótido al ADN telomérico (Bryan y Cech, 1999). De esta forma, los telómeros mantienen una longitud superior al umbral crítico, evitando la activación de las barreras antiproliferativas (senescencia y crisis/apoptosis) y permitiendo la multiplicación ilimitada de las células descendientes.

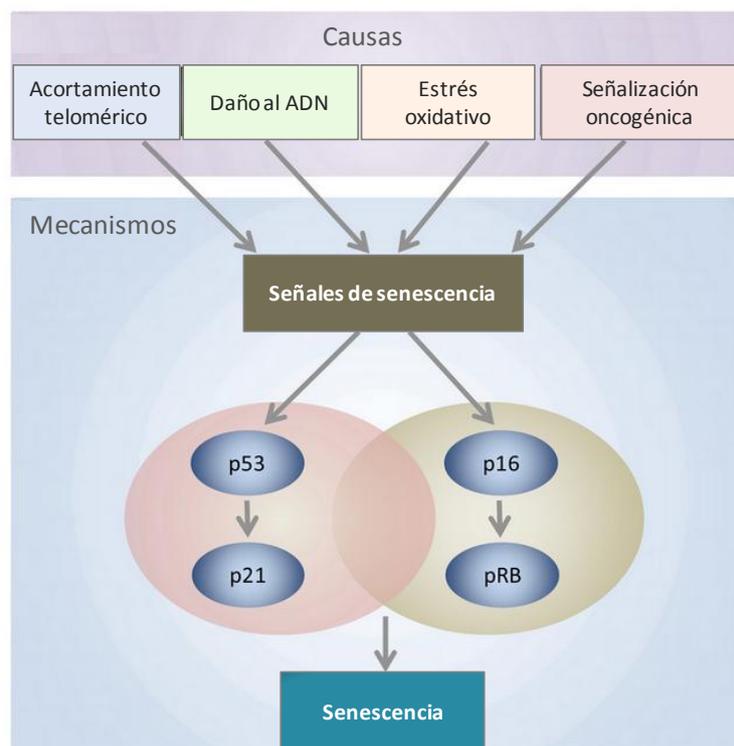


Figura 1.9. Señales inductoras de senescencia y principales mecanismos implicados en el arresto permanente del ciclo celular.

Actualmente, diversas evidencias apuntan a que en las lesiones incipientes, las células cancerígenas atraviesan una fase de crisis inducida por la pérdida telomérica relativamente pronto durante el curso de la progresión tumoral, debido a una ausencia de expresión de la enzima telomerasa en estos estadios (Kawai *et al.*, 2007; Hansel *et al.*, 2006; Raynaud *et al.*, 2010).

Esta deficiencia transitoria en la expresión de la enzima telomerasa actuaría promoviendo la progresión tumoral dado que las alteraciones genómicas que se producen durante la fase de crisis aceleran la adquisición de mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores. La activación tardía de la actividad telomerasa serviría para reconstituir los telómeros, estabilizando así el genoma mutante adquirido durante esta crisis y confiriendo a las células la capacidad replicativa ilimitada necesaria para generar tumores clínicamente aparentes (Artandi y DePinho, 2010).

Además de por el acortamiento telomérico, se ha observado la inducción de senescencia en respuesta a una señalización oncogénica excesiva, como un mecanismo protector frente al desarrollo de tumores. También se ha observado inducción de senescencia ante el estrés oxidativo y el daño al ADN (Courtois-Cox *et al.*, 2008). Aunque las interconexiones entre estas formas de senescencia y la inducida por el acortamiento telomérico son desconocidas, la inducción de p21^{CIP1} por la vía de p53 y la inducción de p16^{INK4a} parecen claves en el arresto permanente del ciclo celular inducido por todas ellas (Figura 1.9) (Campisi y d'Adda di Fagagna, 2007).

1.1.3.5. Inducción de la angiogénesis

Al igual que los tejidos normales, los tumores necesitan un aporte de nutrientes y oxígeno, así como la eliminación de desechos metabólicos y CO₂. Estas necesidades se cubren gracias a que durante la progresión tumoral se produce la activación sostenida de la angiogénesis que hace que la vasculatura, que normalmente se encuentra quiescente, esté continuamente generando nuevos vasos que sustentan el crecimiento neoplásico (Hanahan y Folkman, 1996). El interruptor de la angiogénesis está regulado por el balance entre factores inductores e inhibidores de la angiogénesis, algunos de los cuales son proteínas de señalización que se unen a receptores estimuladores o inhibidores de las células del endotelio vascular.

El prototipo de inductor de la angiogénesis es el factor de crecimiento del endotelio vascular-A (VEGF-A, acrónimo del inglés *vascular endothelial growth factor A*) que está implicado en orquestar el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos y en la homeostasis de las células endoteliales durante el desarrollo embrionario y postnatal, así como en distintas situaciones fisiológicas y patológicas en el adulto. VEGF señala a través de tres receptores tirosina quinasa (VEGFR 1-3) y esta señalización se encuentra regulada a múltiples niveles. Así, por ejemplo, la expresión de VEGF puede verse aumentada por la hipoxia y por la señalización oncogénica (Ferrara, 2009; Mac Gabhann y Popel, 2008; Carmeliet, 2005). Adicionalmente, las moléculas de VEGF pueden ser secuestradas en la matriz extracelular en una forma latente sujeta a liberación y activación por proteasas de matriz como MMP-9 (Kessenbrock *et al.*, 2010). La trombospondina-1 (TSP-1) es el prototipo de inhibidor de la angiogénesis que constituye el contrapeso clave del interruptor angiogénico. También se une a receptores de las células endoteliales, desencadenando señales supresoras que contrarrestan los estímulos proangiogénicos (Kazerounian *et al.*, 2008).

Los vasos sanguíneos producidos en los tumores por la activación crónica de la angiogénesis bajo los efectos de una mezcla desequilibrada de señales proangiogénicas son típicamente aberrantes. Esta neovasculatura se caracteriza por un brote precoz de capilares, una ramificación vascular excesiva y enrevesada, vasos retorcidos y agrandados, flujo sanguíneo irregular, microhemorragias, permeabilidad alterada, y niveles anormales de proliferación y apoptosis de las células endoteliales (Nagy *et al.*, 2010; Baluk *et al.*, 2005). Históricamente, la angiogénesis era concebida como un rasgo importante una vez formados los tumores macroscópicos de crecimiento

rápido. Sin embargo, datos más recientes indican que la angiogénesis se induce de forma temprana durante el desarrollo tumoral y también contribuye a la fase de progresión neoplásica microscópica premaligna (Raica *et al.*, 2009).

En algunos tumores, la sobreexpresión de factores angiogénicos es inducida por oncogenes dominantes como *RAS* y *MYC*, demostrando que distintos rasgos distintivos de las células tumorales pueden estar corregulados por los mismos agentes transformantes. Sin embargo, en otros tumores, estas señales son producidas indirectamente por las células inflamatorias del sistema inmune (Baudino *et al.*, 2002; Kranenburg *et al.*, 2004).

1.1.3.6. Invasión y metástasis

La capacidad de invasión y metástasis permite a las células tumorales escapar del tumor primario para invadir tejidos adyacentes y viajar a tejidos distantes donde pueden colonizar. En el año 2000, los mecanismos subyacentes a los procesos de invasión y metástasis eran un enigma, aunque se sabía que las células desarrollaban alteraciones en su forma y en el anclaje a otras células y a la matriz extracelular. La alteración mejor caracterizada implicaba la pérdida de E-cadherina que forma las uniones adherentes célula-célula y se expresa de forma ubicua en las células epiteliales. El acoplamiento entre células adyacentes a través de E-cadherina resulta en la transmisión de señales que mantienen la quiescencia celular gracias a la conexión con circuitos de señalización intracelulares a través de β -catenina. En la mayoría de carcinomas humanos, la expresión de E-cadherina se encuentra disminuida, o bien existen mutaciones que inactivan a esta proteína. De forma inversa, moléculas de adhesión normalmente asociadas con las migraciones que ocurren durante la embriogénesis y la inflamación están normalmente sobreexpresadas en los tumores. Por ejemplo, N-cadherina, que normalmente se expresa en neuronas y células mesenquimales en migración durante la organogénesis, está sobreexpresada en muchas células cancerígenas invasivas. Pero más allá de la ganancia o la pérdida de expresión de estas proteínas de anclaje célula-célula/matriz, los reguladores clave de la invasión y metástasis eran en gran parte desconocidos (Cavallaro y Christofori, 2004).

El proceso de invasión y metástasis se puede esquematizar como una secuencia de etapas discretas acompañadas de cambios biológicos. Esta cascada de invasión-metástasis comenzaría con la invasión local, seguida de la intravasación de las células tumorales en los vasos sanguíneos y linfáticos cercanos, el tránsito de las células cancerígenas a través del sistema linfático y hemático, la extravasación de las células cancerígenas al parénquima de los tejidos distantes, la formación de micrometástasis y, finalmente, el crecimiento de estas lesiones para dar lugar a tumores macroscópicos (Talmadge y Fidler, 2010).

En los últimos años, se ha descrito que las células epiteliales transformadas podrían adquirir la capacidad de invadir y diseminarse por medio de la activación, transitoria o estable, de un programa regulador del desarrollo denominado transición epitelio-mesénquima (EMT) que está implicado en varias etapas de la morfogénesis embrionaria y de la cicatrización de las heridas. Los encargados de orquestar la EMT y los procesos migratorios relacionados durante la embriogénesis son un grupo de factores de transcripción de acción pleiotrópica entre los que se incluyen Snail, Slug, Twist y Zeb1/2. Estos reguladores transcripcionales se expresan en distintas combinaciones en varios tumores malignos y se ha comprobado en modelos experimentales que su sobreexpresión elicitó la invasión y la metástasis (Micalizzi *et al.*, 2010; Taube *et al.*, 2010; Schmalhofer *et al.*, 2009; Yang y Weinberg, 2008). Entre las características biológicas evocadas por estos factores de transcripción se encuentran

la pérdida de las uniones adherentes y la conversión de una morfología poligonal/epitelial a una morfología fusiforme/fibroblástica, la expresión de enzimas que degradan la matriz, el incremento de la motilidad y una mayor resistencia a la apoptosis, todas ellas características implicadas en el proceso de invasión y metástasis (Figura 1.10). Varios de estos factores de transcripción pueden reprimir directamente la expresión de E-cadherina, privando así a las células epiteliales neoplásicas de este supresor clave de la motilidad y la invasividad (Peinado *et al.*, 2004). Evidencias procedentes de la genética del desarrollo indican que, en el embrión, los desencadenantes de la expresión de estos factores de transcripción serían las señales contextuales recibidas de las células vecinas. De forma análoga, existe una evidencia creciente de que las interacciones heterotípicas de las células cancerígenas con las células del estroma neoplásico adyacente pueden inducir la expresión de los fenotipos malignos desencadenados por estos reguladores transcripcionales (Karnoub y Weinberg, 2006; Brabletz *et al.*, 2001).

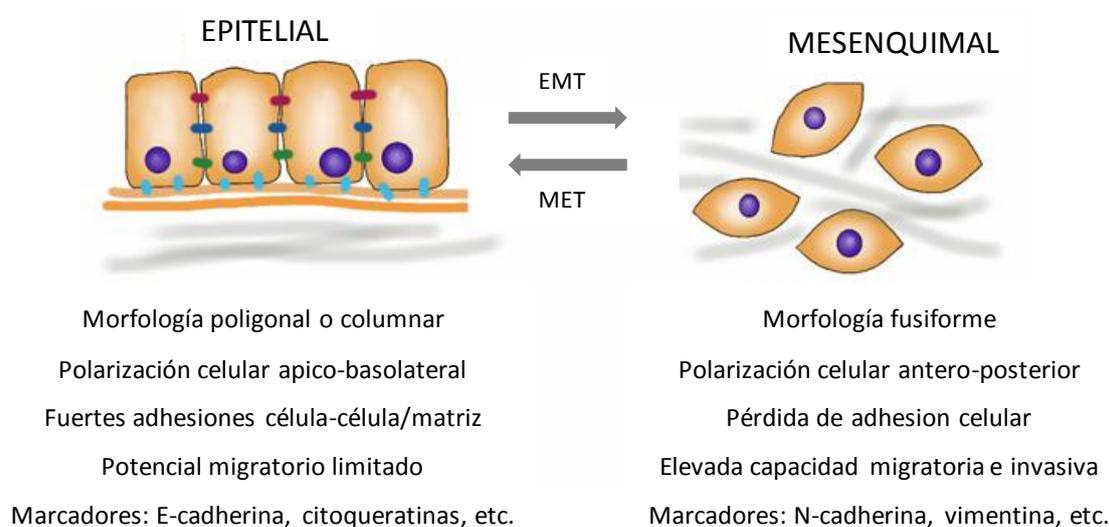


Figura 1.10. Características asociadas a los fenotipos epitelial y mesenquimal, y su interconversión mediante los procesos de EMT y MET.

El papel de las señales del estroma en la inducción de la capacidad invasiva implica la reversibilidad de esta característica. De esta manera, aquellas células que se han diseminado desde el tumor primario hacia un tejido distante ya no se beneficiarían de las señales inductoras de invasión y EMT procedentes del estroma tumoral activado por lo que, en ausencia de estas señales, las células cancerígenas podrían revertir en su nueva localización hacia un estado no invasivo. Así, las células tumorales que habrían sufrido EMT durante la invasión inicial y la diseminación metastásica, podrían pasar por el proceso inverso denominado transición mesénquima-epitelio (MET) (Figura 1.10) (Hugo *et al.*, 2007).

El último paso del proceso de metástasis sería la adaptación de las células cancerígenas al nuevo microambiente tisular, es decir, la colonización y el crecimiento de las micrometástasis para generar macrometástasis. Muchas de estas micrometástasis permanecen latentes durante años, indicando que la mayoría de las células cancerígenas diseminadas están poco adaptadas, al menos inicialmente, al microambiente tisular en el cuál han aterrizado. De esta forma, para poder prosperar, estas células necesitan desarrollar sus propios programas que le permitan adaptarse al nuevo ambiente. De

hecho, los distintos tumores muestran un claro tropismo por ciertos tejidos. Aunque recientemente se han descrito grupos de genes que constituyen “firmas metastásicas” que parecen facilitar la colonización de determinados tejidos, todavía se necesita más investigación para arrojar luz a este asunto (Peinado *et al.*, 2011; Coghlin y Murray, 2010).

1.1.3.7. Características facilitadoras

Inestabilidad genética

La adquisición de las habilidades descritas anteriormente depende en gran medida de una sucesión de alteraciones en el genoma de las células neoplásicas. Ciertos genotipos mutantes confieren una ventaja selectiva a determinados subclones de células, permitiéndoles un crecimiento superior al resto y una dominancia en el ambiente tisular local. Así, la progresión tumoral puede describirse como una sucesión de expansiones clonales, cada una de las cuales es desencadenada por la adquisición al azar de un genotipo mutante ventajoso. Además, algunas de estas expansiones clonales podrían estar desencadenadas por cambios epigenéticos que afectan a la regulación de la expresión génica (Berdasco y Esteller, 2010; Jones y Baylin, 2007).

La tasa de mutación espontánea es muy baja en cada división celular gracias a la extraordinaria capacidad de los sistemas de mantenimiento del genoma para detectar y resolver defectos en el ADN. En el curso del proceso de tumorigénesis, las células tumorales incrementan la tasa de mutación aumentando la susceptibilidad a agentes mutagénicos, desajustando los mecanismos de mantenimiento del genoma, o ambos. Además, la acumulación de mutaciones se puede acelerar comprometiendo los mecanismos de vigilancia que normalmente monitorizan la integridad del genoma y fuerzan a las células con daño genético a entrar en senescencia o apoptosis. Aquí es esencial el papel de p53 y por ello se le conoce como “el guardián del genoma” (Jackson y Bartek, 2009; Kastan, 2008; Sigal y Rotter, 2000).

La colección de defectos que afectan a componentes de la maquinaria de mantenimiento del ADN es muy amplia e incluye genes cuyos productos están implicados en la detección de los daños en el ADN y en la activación de la maquinaria de reparación, en la reparación del ADN dañado y en la inactivación de agentes mutagénicos antes de que hayan dañado el ADN (Negrini *et al.*, 2010; Jackson y Bartek, 2009). Otra fuente de inestabilidad genómica asociada al tumor la constituye la pérdida del ADN telomérico que, en muchos tumores, genera inestabilidad cariotípica que conlleva a la amplificación y delección de segmentos cromosómicos (Artandi y DePinho, 2010). Desde esta perspectiva, la telomerasa es más que una facilitadora de la adquisición del potencial replicativo ilimitado y debe añadirse a la lista de proteínas responsables del mantenimiento de la integridad del genoma.

Inflamación promotora del tumor

Desde hace tiempo se conoce que prácticamente todas las lesiones neoplásicas están infiltradas por células del sistema inmune. Se pensaba que esta respuesta inflamatoria reflejaba principalmente un intento del sistema inmune de erradicar los tumores y, de hecho, existe una evidencia creciente de la existencia de una respuesta inmune antitumoral en muchos tipos de tumores que ejerce una presión sobre el tumor. Sin embargo, numerosas investigaciones han puesto de manifiesto que esta respuesta inflamatoria asociada al tumor promueve la adquisición de las capacidades distintivas de

las células tumorales descritas anteriormente mediante el suministro de moléculas bioactivas al microambiente tumoral como factores de crecimiento que mantienen la señalización proliferativa, factores de supervivencia que limitan la muerte celular, factores proangiogénicos, enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan la angiogénesis, la invasión y la metástasis, y señales inductoras que activan programas como la EMT. Adicionalmente, las células inflamatorias pueden liberar compuestos químicos como especies reactivas de oxígeno, que son mutagénicos para las células vecinas, acelerando la evolución genética hacia estados de mayor malignidad (DeNardo *et al.*, 2010; Grivennikov *et al.*, 2010; Karnoub y Weinberg, 2006). La inflamación es evidente en los estadios iniciales de la progresión neoplásica y es capaz de favorecer el desarrollo de las neoplasias incipientes en cánceres propiamente dichos (Qian y Pollard, 2010). Por ello, la inflamación se considera una característica que contribuye a la adquisición de las capacidades distintivas de las células tumorales.

1.1.3.8. Características emergentes

Reprogramación del metabolismo energético

La proliferación celular crónica e incontrolada de un tumor implica ajustes en el metabolismo energético para mantener el crecimiento y la división celular. En condiciones aeróbicas las células normales convierten la glucosa en piruvato mediante la glucólisis en el citosol y, después, éste es convertido en dióxido de carbono en la mitocondria mediante el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. En condiciones anaeróbicas se favorece la glucólisis y relativamente poco piruvato es procesado en la mitocondria. Otto Warburg fue el primero en observar que, incluso en presencia de oxígeno, las células cancerígenas limitan el metabolismo de la glucosa y la producción de energía a la glucólisis (Warburg, 1931, 1956a, 1956b). Para compensar la menor eficiencia energética de la glucólisis en comparación con la fosforilación oxidativa, las células tumorales sobreexpresan transportadores de glucosa como GLUT1, que esencialmente incrementa la importación de glucosa al citoplasma. Este abastecimiento glucolítico está asociado con la activación de oncogenes como *RAS* y *MYC* y la mutación de genes supresores tumorales como *TP53*. Esta dependencia de la glucólisis se puede ver acentuada bajo las condiciones de hipoxia que normalmente se dan en el interior de muchos tumores y cuya respuesta favorece la expresión de transportadores de glucosa y enzimas de la vía glucolítica (Jones y Thompson, 2009; DeBerardinis *et al.*, 2008). De hecho, ambos, *RAS* y la hipoxia, pueden incrementar los niveles de los factores de transcripción *HIF1 α* y *HIF2 α* que regulan la glucólisis al alza (Semenza, 2010; Kroemer y Pouyssegur, 2008).

Este cambio energético en las células cancerígenas hacia la glucólisis a pesar de la baja eficiencia energética de ésta puede ser explicado porque la glucólisis permite la desviación de intermediarios hacia varias vías biosintéticas, incluyendo aquellas que generan nucleótidos y aminoácidos, lo que facilita la biosíntesis de macromoléculas y orgánulos necesarios para el ensamblaje de nuevas células. De hecho, este tipo de metabolismo parece estar presente en muchos tejidos embrionarios que se dividen rápidamente para sustentar los programas biosintéticos a gran escala que se necesitan para una proliferación celular activa.

Curiosamente, se ha visto que algunos tumores tienen dos poblaciones de células tumorales que difieren en sus vías generadoras de energía: una subpoblación dependiente de glucosa cuyas células secretan lactato, y una segunda subpoblación de células que importan y utilizan el lactato producido por las anteriores como principal fuente de energía a través del ciclo del ácido cítrico. Estas dos

poblaciones funcionan simbióticamente; las células cancerígenas hipóxicas dependen de la glucosa y secretan lactato como desecho, el cual es importado y utilizado preferentemente como combustible por aquellas mejor oxigenadas (Kennedy y Dewhirst, 2010; Feron, 2009; Semenza, 2008).

Evasión de la destrucción por el sistema inmune

Las células y los tejidos son monitorizadas constantemente por el sistema inmune y esta vigilancia es responsable de reconocer y eliminar la mayoría de células tumorales incipientes. De acuerdo con esto, para poder progresar, los tumores deben lograr evitar la detección y destrucción por el sistema inmune.

En modelos murinos se ha demostrado que la deficiencia en linfocitos T citotóxicos CD8+, en linfocitos T *helper 1* CD4+, o en células *natural killer* (NK) provoca un aumento de la incidencia de tumores, indicando que tanto la respuesta inmune innata como la respuesta inmune adaptativa contribuyen significativamente a la vigilancia y erradicación de los tumores (Teng *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007). Además, experimentos de trasplante tumoral han mostrado que las células tumorales originadas en ratones inmunodeficientes son incapaces de iniciar tumores en ratones inmunocompetentes singénicos, mientras que las células tumorales originadas en ratones inmunocompetentes son igualmente eficientes a la hora de iniciar tumores trasplantados en ambos tipos de ratones. Este comportamiento se debe a que en los huéspedes inmunocompetentes los clones tumorales altamente inmunogénicos son rutinariamente eliminados y solo aquellas células débilmente inmunogénicas son capaces de evadir esta destrucción, prosperar y generar tumores sólidos. A este proceso se le ha denominado inmunoedición (Smyth *et al.*, 2006).

La existencia de una respuesta inmune antitumoral se apoya además en evidencias epidemiológicas. Por ejemplo, pacientes con tumores de colon y ovario con una gran infiltración por linfocitos T citotóxicos y células NK tienen un mejor pronóstico que aquellos con ausencia de estas células (Pages *et al.*, 2010; Nelson, 2008). Además, en algunos casos pacientes inmunosuprimidos que recibieron un trasplante de algún órgano procedente de un donante sano desarrollaron cánceres derivados del donante, indicando que en los donantes aparentemente sanos había células tumorales que estaban siendo mantenidas bajo control en un estado latente gracias a que su sistema inmune era completamente funcional (Strauss y Thomas, 2010).

En realidad, la discusión anterior supone una simplificación de las interacciones entre el tumor y el sistema inmune puesto que se conoce que las células tumorales altamente inmunogénicas son capaces de evadir la destrucción inmune inhabilitando determinados componentes del sistema inmune encargados de eliminarlas. Por ejemplo, las células cancerígenas pueden paralizar a los linfocitos T citotóxicos y a las células NK mediante la secreción de TGF- β u otros factores inmunosupresores (Yang *et al.*, 2010; Shields *et al.*, 2010). Incluso existen mecanismos más sutiles que operan a través del reclutamiento de células inflamatorias inmunosupresoras, incluyendo a linfocitos T reguladores y células supresoras derivadas de la serie mieloide que pueden suprimir la acción de las células citotóxicas (Mougiakakos *et al.*, 2010; Ostrand-Rosenberg y Sinha, 2009).

1.2. CÁNCER DE PIEL.

El cáncer de piel es la neoplasia más común en el ser humano y su frecuencia ha aumentado en los últimos años a nivel mundial. Clásicamente el cáncer de piel se ha dividido en dos grandes grupos: el cáncer de piel no melanoma y el melanoma. Esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio del cáncer de piel de tipo melanoma.

1.2.1. CÁNCER DE PIEL DE TIPO NO MELANOMA

El cáncer de piel no melanoma incluye todos los tipos de cáncer que se originan en las distintas células que constituyen la piel, exceptuando a los melanocitos. Principalmente hace referencia al carcinoma basocelular y al carcinoma de células escamosas dado que, en conjunto, constituyen más del 95% de todos los cánceres de piel de tipo no melanoma.

El **carcinoma basocelular** se origina en las células del estrato basal que es la capa más interna de la epidermis (Figura 1.11) y supone el 78% de los cánceres de piel. Suele aparecer en la cara, la nariz y la frente como un área elevada de la piel que puede ser brillante y con pequeños vasos sanguíneos o bien presentar ulceración. Se trata de un carcinoma de crecimiento lento que no suele diseminarse a áreas distantes ni suele resultar en la muerte del individuo aunque, de no ser tratado, puede llegar a ser desfigurante, causar sangrado y producir destrucción local en ojos, nariz, orejas y labios.

El **carcinoma de células escamosas o espinocelular** se origina a partir de las células del estrato espinoso de la epidermis (Figura 1.11) y supone el 20% de los cánceres de piel. Suele desarrollarse en zonas de la piel expuestas al Sol pero, a diferencia del carcinoma basocelular, también puede originarse en otras partes del cuerpo como genitales, mucosas, palmas de las manos y plantas de los pies. Comienza como una zona roja con la superficie costrosa, descamativa, que no cura. A medida que crece, el tumor puede volverse nodular y duro y en ocasiones presenta una superficie verrugosa. Al final el cáncer se convierte en una úlcera abierta y crece dentro del tejido subyacente. Generalmente solo afecta a la zona que lo rodea, pero puede producir metástasis a ganglios regionales u otros órganos.

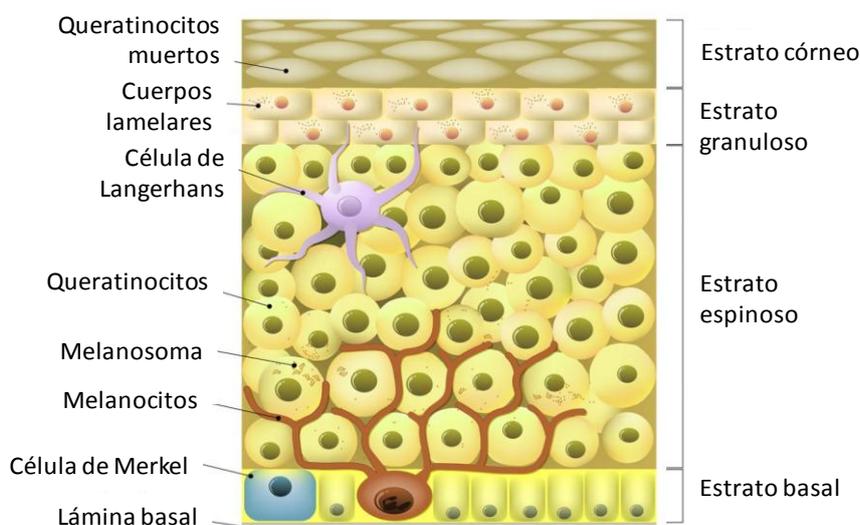


Figura 1.11. Esquema de los estratos de la epidermis y las distintas células presentes en cada uno de ellos.

También se incluyen en esta categoría otros cánceres menos frecuentes como el adenocarcinoma de glándulas sudoríparas, el carcinoma de glándulas sebáceas, el carcinoma de células de Merkel (de origen neuroendocrino), algunos linfomas cutáneos y algunos sarcomas como el sarcoma de Kaposi, el dermatofibrosarcoma protuberans o el sarcoma epiteliode.

1.2.2. MELANOMA

Es una neoplasia que tiene su origen en los melanocitos que son las células responsables de dar coloración a la piel, el pelo y los ojos gracias a que producen un pigmento denominado melanina. El melanoma afecta a la piel en el 90% de los casos, pero también puede originarse a partir de melanocitos no cutáneos localizados en la coroides del ojo, las leptomeninges y los tractos genitourinario y gastrointestinal. Tiene una gran capacidad para metastatizar y, a pesar de ser menos frecuente que los cánceres de piel de tipo no melanoma, es el responsable del 75% de las muertes por cáncer de piel. El diagnóstico temprano es particularmente importante ya que la supervivencia disminuye de manera drástica a medida que el tumor profundiza en la dermis.

1.2.2.1. Melanocitos y melanoma

El melanoma cutáneo se origina por la proliferación incontrolada de los melanocitos epidérmicos que son las células responsables de dar coloración a la piel y protegerla de la luz ultravioleta (UV). Esta función la cumplen gracias a su capacidad de sintetizar y almacenar melanina en unos orgánulos especiales denominados melanosomas. En la piel, los melanocitos se distribuyen en la membrana basal, situada entre la epidermis y la dermis (Figura 1.11), desde donde transfieren los melanosomas a los queratinocitos circundantes mediante un mecanismo de transporte que ocurre a nivel de sus dendritas.

Cuando la piel se expone a la luz UV, los queratinocitos estimulan a los melanocitos a producir melanina. La capacidad de los queratinocitos para estimular la producción de pigmento es consecuencia del daño en el ADN causado por la luz UV, que induce la estabilización de la proteína supresora de tumores p53. Ésta induce la expresión de la proopiomelanocortina (POMC) que es fragmentada para producir la hormona estimulante de los melanocitos (α -MSH, acrónimo del inglés *melanocyte stimulating hormone*) que es liberada por los queratinocitos (Cui *et al.*, 2007).

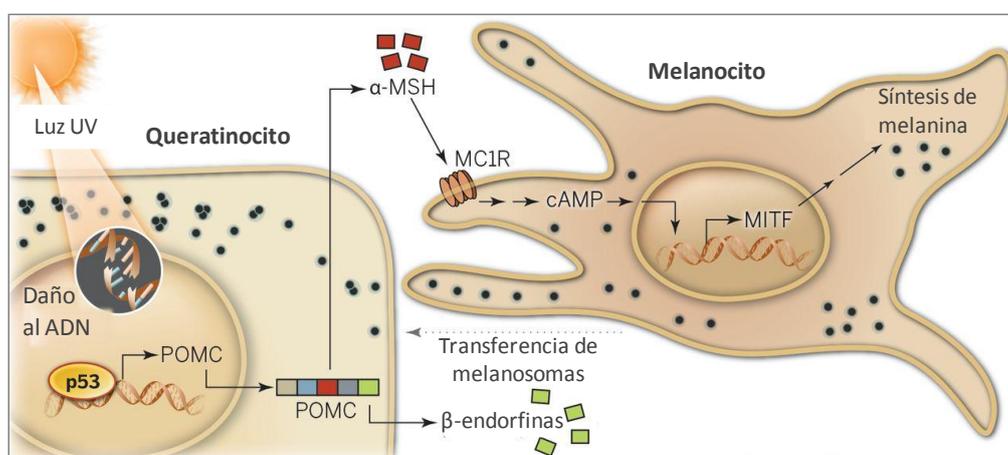


Figura 1.12. Mecanismo de estimulación de la síntesis de melanina por los melanocitos ante la radiación UV.

La α -MSH estimula a los melanocitos a través de su unión al receptor de melanocortina 1 (MC1R). Este receptor es altamente polimórfico y existen variantes que no desencadenan señalización intracelular que son responsables del fenotipo de cabello pelirrojo y piel clara (Valverde *et al.*, 1995). La activación de MC1R conduce a la elevación de los niveles de AMPc en los melanocitos que induce un aumento de la expresión del factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) que, a su vez, induce la expresión de los genes responsables de la síntesis de melanina y la biogénesis de melanosomas. La melanina sintetizada es empaquetada en los melanosomas y transportada hacia los queratinocitos que disponen estos melanosomas alrededor de su núcleo para proteger a su ADN de la luz UV (Figura 1.12) (Garibyan y Fisher, 2010).

Los dos tipos más comunes de melanina son la eumelanina, de color marrón a negro, y la feomelanina, de color amarillo a rojo. La eumelanina es capaz de absorber radiación UV dañina y transformar la energía en calor a través de un proceso químico denominado conversión interna. Esta propiedad fotoprotectora permite a la melanina disipar casi toda la radiación UV en forma de calor, evitando que alcance el ADN genómico donde podría causar daños. Por el contrario, la feomelanina no tiene esta propiedad de absorción de luz UV, y podría contribuir a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Garibyan y Fisher, 2010).

1.2.2.2. Patogénesis del melanoma

Se piensa que el melanoma se desarrolla según un modelo de progresión secuencial que comenzaría con una proliferación aberrante de los melanocitos debido a alguna alteración genética, presumiblemente causada por la radiación UV, que daría lugar a los *nevi* 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 *nevi* pueden sobrepasar estos mecanismos de senescencia, 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, las células pasan 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 a hígado, pulmón y cerebro (Figura 1.13).

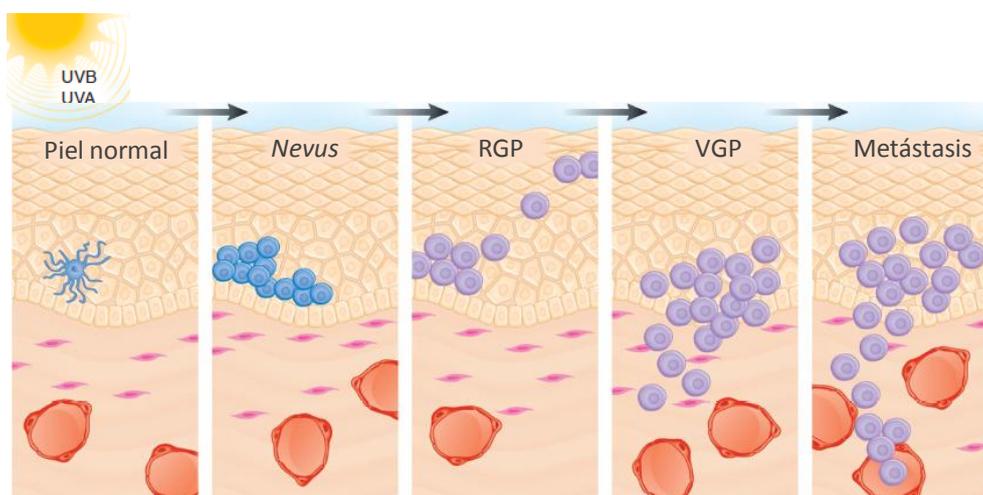


Figura 1.13. Esquema del modelo de desarrollo y progresión secuencial del melanoma.

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).

1.2.2.3. Clasificación histológica del melanoma

Existen cuatro subtipos histológicos de melanoma con características clínicas y de comportamiento biológico diferentes entre sí:

Melanoma de extensión superficial: es el tipo más común, comprendiendo el 70% de los casos de melanoma. Generalmente es una lesión plana e irregular con diferentes tonos de pigmentación. Conforme avanza puede mostrar una zona infiltrada o elevada. Es más común en personas de raza blanca (Figura 1.14; A).

Melanoma nodular: supone entre el 15 y el 30% de los melanomas. Es un tumor saliente, cuya superficie puede ser lisa o vegetante, de color negro-azulado o rojo-azulado, aunque algunos pueden carecer de pigmento (amelanóticos). Esta variedad carece de fase radial de crecimiento y casi desde el inicio tiene crecimiento vertical e invasivo, con mucha tendencia a diseminarse (Figura 1.14; B).

Melanoma lentigo maligno: supone un 5% de los melanomas y se observa en personas de edades avanzadas como una mancha hiperpigmentada, irregular, de larga evolución. Es más común en la piel dañada por el Sol (cara, cuello y brazos). Es el menos agresivo, pudiendo permanecer *in situ* por varios años hasta que aparece endurecimiento o ulceración que indican su progresión hacia un melanoma invasivo (Figura 1.14; C).

Melanoma lentiginoso acral: es la forma menos común de melanoma (menos de un 5%), aunque es más común en personas de raza negra. Generalmente aparece en las palmas de las manos, las plantas de los pies o debajo de las uñas. Empieza como una lesión macular, con pigmentación irregular de diversos tonos, se extiende en forma radial, para después hacerse infiltrante, queratósica, con lesiones elevadas o vegetantes en el centro (Figura 1.14; D).

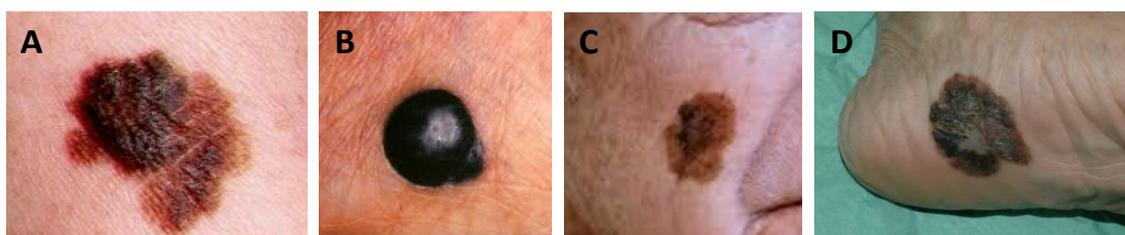


Figura 1.14. Subtipos histológicos de melanoma. (A) Melanoma de extensión superficial. (B) Melanoma nodular. (C) Melanoma lentigo maligno. (D) Melanoma lentiginoso acral.

1.2.2.4. Epidemiología

Según las estimaciones realizadas por GLOBOCAN, en 2012 se diagnosticaron unos 232 000 nuevos casos de melanoma maligno cutáneo y se produjeron unas 55 000 muertes por esta enfermedad a nivel mundial (Ferlay *et al.*, 2015). La amplia mayoría de los casos (85%) ocurren en países desarrollados donde, en general, el melanoma se sitúa como el sexto cáncer más frecuentemente diagnosticado (Erdmann *et al.*, 2013). El riesgo de desarrollar un melanoma cutáneo

es aproximadamente 10 veces superior en la población blanca que en la población negra, asiática o hispana, presumiblemente debido a la mayor sensibilidad de la piel blanca a la exposición solar (Markovic *et al.*, 2007).

En las últimas cuatro décadas se ha producido un incremento sostenido de la incidencia de melanoma en la población Caucásica (blanca). Estadísticas sobre el cáncer realizadas en Estados Unidos han puesto de manifiesto que, mientras que a comienzos de los años 70 la incidencia de melanoma era de 6 casos por cada 100 000 habitantes al año, a principios del año 2000 esta incidencia ya alcanzaba los 18 casos por cada 100 000 habitantes al año, demostrando un incremento de 3 veces en la tasa de incidencia en estas 3 décadas. De forma similar, en el centro de Europa, la tasa de incidencia en el mismo periodo se incrementó desde 3-4 casos hasta 10-15 casos por cada 100 000 habitantes al año. La tasa de incidencia más elevada se ha registrado en Australia y Nueva Zelanda, pasando en dicho periodo desde 40 hasta 60 casos por cada 100 000 habitantes al año. A nivel Europeo, las tasas de incidencia más elevadas se han registrado en los países Escandinavos, pero también se ha producido un significativo incremento de la incidencia de melanoma en el centro y el sur de Europa. Sin embargo, los países mediterráneos tienen las tasas de incidencia más bajas de toda Europa. La razón de este gradiente norte-sur parece ser la diferencia en cuanto al fototipo de piel, el cual suele ser más bajo a medida que aumenta la latitud (Figura 1.15) (Garbe y Leiter, 2009).

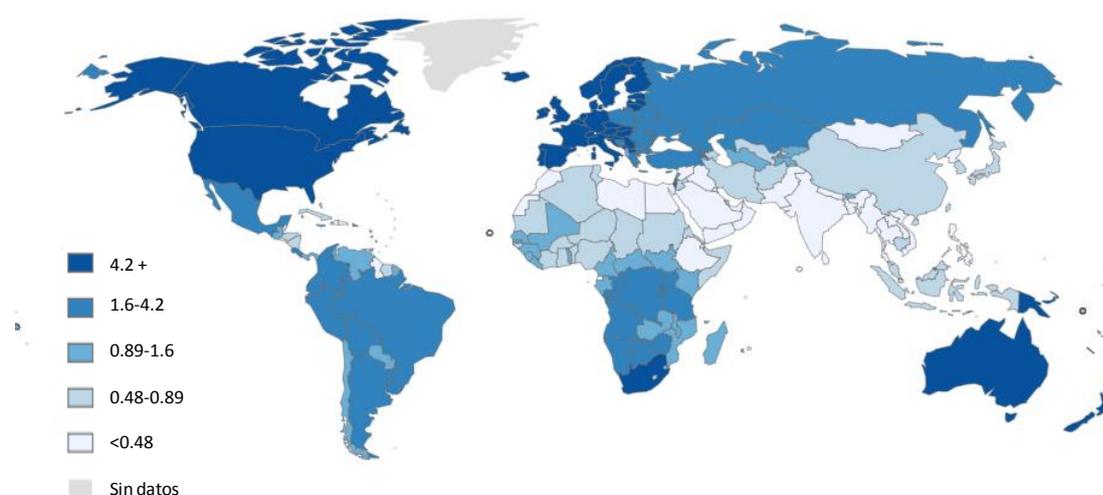


Figura 1.15. Incidencia de melanoma por cada 100 000 habitantes normalizada por la edad según los datos de GLOBOCAN 2012.

Del mismo modo, las tasas de mortalidad también sufrieron un incremento durante los años 70 y 80. Sin embargo, a partir de los años 90, se observó una estabilización de las tasas de mortalidad en numerosos países. Esta estabilización se ha relacionado con cambios en los patrones de exposición solar en las generaciones más jóvenes, así como con la mejora en el diagnóstico precoz del melanoma, que en la actualidad es el principal factor pronóstico favorable (Garbe y Leiter, 2009).

La media de edad de presentación del melanoma es de aproximadamente 55 años, pero puede variar en función del grosor y el subtipo histológico. Así por ejemplo, los melanomas de extensión superficial, normalmente de bajo espesor, aparecen en individuos más jóvenes, mientras que los melanomas nodulares y lentigos malignos tienden a afectar a individuos de edades más avanzadas.

La incidencia es muy similar en hombres y mujeres, aunque los últimos estudios realizados por GLOBOCAN en 2012 muestran una incidencia ligeramente superior en hombres (Ferlay *et al.*, 2015). Los sitios de aparición más frecuentes son los brazos y las piernas en mujeres y el tronco en hombres (Bataille y de Vries, 2008).

España presenta una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad en melanoma de Europa, a pesar de que la incidencia también se ha incrementado notablemente en nuestro país en las últimas décadas. Representa el 1.3 y el 2.5 % de los tumores malignos en varones y mujeres, respectivamente. Las incidencias más altas corresponden a Tarragona en varones y Gerona en mujeres; y las más bajas a Canarias en mujeres y Zaragoza en hombres. Esta mayor incidencia en el sexo femenino nos diferencia del resto de países europeos, donde sucede al contrario. La mortalidad también se ha incrementado en España en las últimas décadas, si bien, al igual que en el resto del mundo, se ha estabilizado en los últimos años. Nuestra cifra de mortalidad es la más baja de todos los países europeos debido posiblemente al diagnóstico y al tratamiento quirúrgico precoces (Sáenz *et al.*, 2005).

1.2.2.5. Factores de riesgo en melanoma

El principal agente etiológico del melanoma es la exposición a la radiación (UV). Pero además, existen otros factores de riesgo importantes como la historia familiar, el número de *nevi*, el fototipo de piel clara y la inmunosupresión.

Radiación UV

Estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto que la exposición intensa e intermitente a la radiación UV y las quemaduras solares, especialmente durante la infancia, constituyen el factor que confiere el riesgo más alto para el desarrollo del melanoma (Whiteman *et al.*, 2001). Además, el uso de dispositivos de bronceado artificial (como las camas solares), que emiten radiación UV directamente sobre la piel, también se ha asociado con un incremento significativo del riesgo de melanoma y este riesgo se incrementa notablemente con el número de sesiones recibidas y con una temprana edad de inicio (<35 años) (Boniol *et al.*, 2012).

Cuando la radiación UV alcanza la piel es absorbida por moléculas denominadas cromóforos. El ADN es un cromóforo directo para la radiación UVB, de manera que cuando determinados electrones del ADN absorben fotones, pasan a un estado excitado y se pueden producir reacciones entre las bases del ADN. Una de las reacciones fotoquímicas que tiene lugar tras la exposición del ADN a la radiación UVB es la formación de dímeros de pirimidina que dan lugar a fotoproductos conocidos como dímeros de pirimidina tipo ciclobutano (CPDs) (por unión covalente de los carbonos C5 y C6 de dos pirimidinas adyacentes) y a pirimidina 6-4 pirimidona (por unión covalente entre los carbonos C6 y C4 de dos pirimidinas adyacentes) (Figura 1.16; A) (Ravanat *et al.*, 2001). Aunque en la mayoría de los casos la maquinaria de reparación del daño al ADN es capaz de reparar estas lesiones, se trata de un proceso propenso a error, de manera que la reparación incorrecta de estos daños da lugar a mutaciones. Cuando estos fotoproductos inducidos por la radiación UVB son reparados incorrectamente, las mutaciones típicas que se producen son transiciones C→T y CC→TT.

Por su parte, la radiación UVA, cuando alcanza la piel, es capaz de excitar cromóforos endógenos generando especies reactivas de oxígeno capaces de causar daño oxidativo en el ADN,

predominantemente en bases de guanina, dando lugar a 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) (Figura 1.16; B) (Cadet *et al.*, 2005). Cuando estas lesiones no son reparadas dan lugar a transversiones G→T y transiciones G→A en el ADN (Besaratina y Pfeifer, 2006).

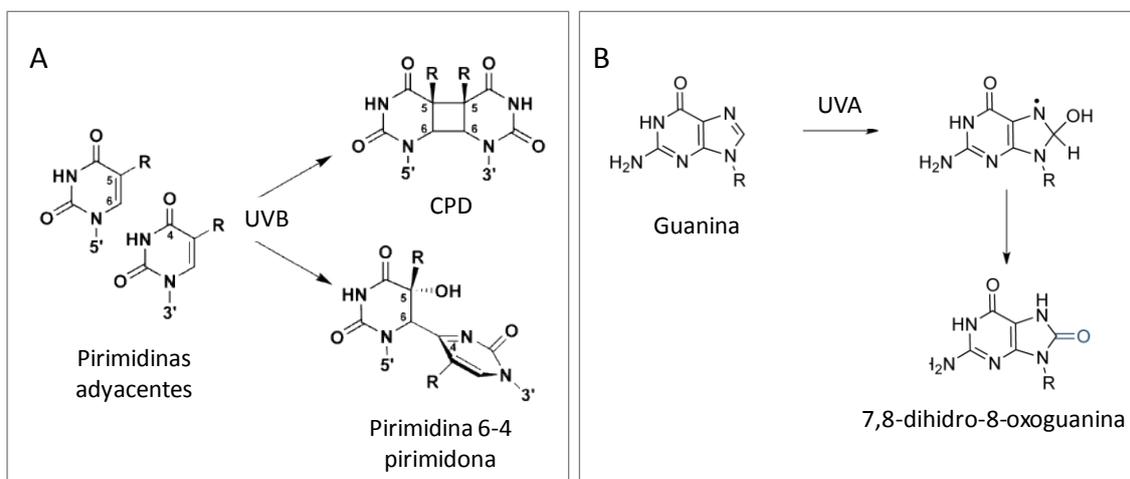


Figura 1.16. Fotoproductos originados por la acción de la radiación UVB (A) y UVA (B) sobre las bases nitrogenadas del ADN.

Las mutaciones inducidas por la luz UV en genes supresores de tumores y protooncogenes clave implicados en apoptosis, reparación del ADN, regulación del ciclo celular y otras vías homeostáticas esenciales constituyen los factores iniciadores clave en la carcinogénesis del melanoma. De hecho, diversos trabajos han implicado a la luz UV como causa de mutaciones en genes importantes asociados al melanoma como *CDKN2A*, *PTEN*, *FGFR2*, *N-RAS* y *BRAF* (Kuphal y Bosserhoff, 2009).

Por otra parte, la radiación UV (tanto UVB como UVA) tiene un efecto inmunosupresor a nivel sistémico debido a la producción de moléculas proinflamatorias solubles, principalmente por parte de los queratinocitos dañados. Entre estas moléculas se incluye el PAF (acrónimo del inglés *platelet activating factor*) que está implicado en inflamación, angiogénesis, curación de heridas, apoptosis e inmunosupresión (Melnikova y Bar-Eli, 2007). Otra de las moléculas producidas por los queratinocitos en respuesta al daño por la luz UV es la prostaglandina PGE_2 que induce la producción de IL-4 e IL-10 que son citoquinas que desvían la respuesta inmune desde Th1 hacia Th2. Puesto que se ha descrito que la respuesta Th2 se asocia con tolerancia del sistema inmune frente al tumor, mientras que la destrucción de las células tumorales requiere una fuerte respuesta Th1, esta desviación de la respuesta inmune hacia Th2 inducida por la radiación ultravioleta favorece el desarrollo del melanoma (Ullrich, 2007). Por último, se ha descrito que la radiación ultravioleta disminuye el número y la función de las células de Langerhans que son células dendríticas localizadas en la piel que juegan un papel crítico para la inducción de la inmunidad cutánea. Por tanto la luz UV, al disminuir la respuesta inmune en la piel, permitiría la progresión de los melanomas primarios (Stene *et al.*, 1988).

Nevi melanocíticos

En el 25% de los casos, el melanoma se desarrolla a partir de un *nevus* preexistente. Estos *nevi* melanocíticos o lunares son acumulaciones benignas de melanocitos que pueden ser congénitas o adquiridas. El riesgo de melanoma varía en base al tipo, tamaño, número y localización de los *nevi*. El

riesgo de melanoma se correlaciona directamente con el número total de *nevi* benignos (displásicos y no displásicos) en el cuerpo, de manera que las personas que presentan entre 11 y 25 *nevi* tienen un riesgo 1.5 veces superior a aquellas con un número menor o igual a 10. Este riesgo se duplica aproximadamente con cada incremento de 25 *nevi*. De forma similar, la presencia de *nevi* de gran tamaño (>5 mm), así como la presencia de *nevi* displásicos (*nevi* con atipia citológica) se asocian con un riesgo significativamente mayor de melanoma (Holly *et al.*, 1987; Garbe *et al.*, 1994). En aquellas personas con historia familiar o personal de melanoma la presencia de *nevi* displásicos confiere un riesgo aún mayor de desarrollar melanoma. De hecho, estos *nevi* displásicos se suelen agrupar en familias con un síndrome denominado síndrome del *nevus* displásico. Los pacientes con este síndrome tienen un riesgo 100 veces superior de desarrollar melanoma y aproximadamente el 50% desarrolla melanoma antes de los 50 años (Tucker *et al.*, 1993).

Historia familiar

Aquellos pacientes con historia de melanoma en un pariente en primer grado tienen aproximadamente un riesgo dos veces superior de desarrollar melanoma que aquellos sin historia familiar de melanoma y este riesgo se incrementa en presencia de otros factores de riesgo. El melanoma familiar supone un 10% de los casos de melanoma. Las alteraciones genéticas más comunes en estas familias son mutaciones en *CDKN2A*. También se han encontrado mutaciones en *CDK4*, aunque con una frecuencia mucho menor (Tsao y Niendorf, 2004). Las características que indican que un paciente con melanoma puede tener una predisposición genética incluyen la presentación temprana (<40 años), múltiples melanomas primarios o historia de lesiones precursoras como *nevi* displásicos. Adicionalmente, el melanoma puede aparecer en familias con síndromes de cáncer familiar como el retinoblastoma familiar (causado por mutaciones germinales en el gen *RB1*), el síndrome de Li-Fraumeni (causado por mutaciones germinales en el gen *TP53*) y el síndrome de Lynch tipo II (causado por mutaciones germinales en los genes de la vía de reparación de desapareamientos en el ADN o *mismatch repair*: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* o *hPMS2*).

Inmunosupresión

La inmunosupresión se ha asociado con un riesgo más elevado de padecer melanoma. Esto se pone de manifiesto en pacientes con SIDA, pacientes con neoplasias hematológicas y aquellos que son tratados con agentes inmunosupresores tras el trasplante de un órgano sólido (Smith *et al.*, 1993; Euvrard *et al.*, 2003).

Características fenotípicas

Ciertas características fenotípicas como ojos de color claro, cabello pelirrojo o rubio, presencia de pecas, sensibilidad al sol e incapacidad o dificultad para broncearse se han asociado con un mayor riesgo de desarrollar melanoma. Este incremento de riesgo podría deberse a variaciones en el receptor MCR1, dado que se ha visto que determinadas variantes están asociadas con estos fenotipos y e incrementan el riesgo tanto de melanoma esporádico como en aquellos casos en los que hay predisposición debida a melanoma familiar. El fenotipo que se asocia con el riesgo más elevado de desarrollar melanoma es el de piel clara, cabello pelirrojo, presencia de pecas e incapacidad para broncearse. Esta observación se ha atribuido tradicionalmente a una reducida protección ultravioleta. Sin embargo, un estudio reciente ha demostrado que el propio proceso de síntesis de feomelanina también contribuye al desarrollo de melanoma a través de un mecanismo

independiente de la radiación UV, debido a los efectos carcinogénicos derivados de la elevada producción de ROS (Mitra *et al.*, 2012; Rees, 2003).

1.2.2.6. Bases moleculares del melanoma

Loci genéticos y variantes asociados con melanoma familiar

Aproximadamente un 10% de los casos de melanoma son hereditarios. Mediante estudios de ligamiento realizados en familias con múltiples casos de melanoma en todo el mundo se han identificado mutaciones germinales en varios genes que confieren predisposición al melanoma. Los más destacados son *CDKN2A*, *CDK4* y *RB1*, cuyas mutaciones hereditarias confieren un alto riesgo de desarrollar melanoma. Además se han descrito variantes del gen *MC1R* que confieren un riesgo moderado de desarrollar esta enfermedad.

CDKN2A

Entre el 20-40% de las familias con predisposición a melanoma presenta mutaciones en el gen *CDKN2A* (*cyclin-dependent-kinase inhibitor 2A*) (Soufir *et al.*, 2007). Se localiza en el cromosoma 9p21 y se trata de un gen compuesto por cuatro exones que codifica para dos proteínas distintas mediante *splicing* alternativo, p16^{INK4a} (exones 1 α , 2 y 3) y p14^{ARF} (exones 1 β y 2). Estas proteínas no comparten ninguna secuencia de aminoácidos debido a que son traducidas en distintos marcos de lectura (las siglas ARF proceden del inglés *alternative reading frame*). Ambas proteínas son potentes supresores tumorales con funciones distintas pero igualmente cruciales en la regulación del ciclo celular y la apoptosis (Chin, 2003).

La proteína p16^{INK4a} se une a CDK4/6 y bloquea su interacción con la ciclina D que es necesaria para su activación, evitando así que este complejo fosforile a la proteína RB. Dado que, como hemos descrito en el apartado **1.1.3.2.** de esta memoria, la fosforilación de RB es necesaria para la liberación del factor de transcripción E2F (responsable de la inducción de los genes de fase S), la pérdida de p16^{INK4a} promueve la transición G1-S y la entrada en el ciclo celular (Figura 1.17) (Koh *et al.*, 1995).

Por otra parte, p14^{ARF} se une a la proteína Mdm2 y promueve su degradación. Puesto que Mdm2 normalmente ubiquitina a p53 y lo marca para su degradación por el proteosoma, el efecto neto de la pérdida de p14^{ARF} es la desestabilización de p53 (Figura 1.17) (Kamijo *et al.*, 1998; Stott *et al.*, 1998).

La mayoría de las mutaciones germinales en este locus asociadas con melanoma familiar afectan a p16^{INK4a} y suelen ser mutaciones de cambio de sentido distribuidas a lo largo de toda la proteína. Tan solo el 1% de las familias con melanoma familiar presenta mutaciones que afectan a p14^{ARF} y son deleciones del gen *CDKN2A* completo, inserciones o mutaciones de *splicing* (Aoude *et al.*, 2015). Varios estudios han estimado el riesgo de desarrollar melanoma en portadores de *CDKN2A* mutante. Para los casos de melanoma familiar, la penetrancia global es del 30% a la edad de 50 años y del 67% a los 80 años (Bishop *et al.*, 2002). Entre los portadores esporádicos de mutación germinal en *CDKN2A* la penetrancia es menor: 14% a los 50 años y 28% a los 80 años. Esto se atribuye a la existencia de otros modificadores coheredados como variantes de *MC1R* que podrían estar incrementando el riesgo en los casos de melanoma familiar (Begg *et al.*, 2005).

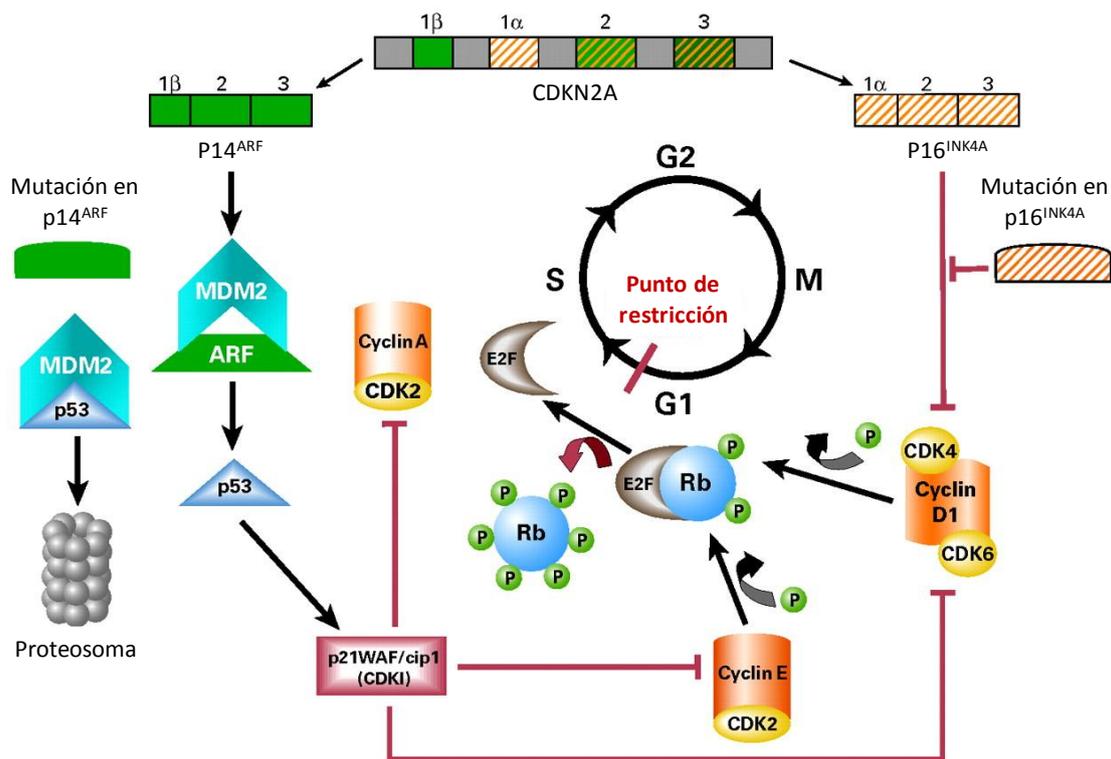


Figura 1.17. Esquema del control del ciclo celular por la vía de RB y la vía de p53, señalando papel de las proteínas p14^{ARF}, p16^{INK4a}, CDK4 y RB implicadas en el melanoma familiar.

CDK4

El gen *CDK4* (acrónimo del inglés *cyclin-dependent-kinase 4*) se localiza en el cromosoma 12q14 y codifica para la proteína quinasa dependiente de ciclinas 4 que, como se ha descrito anteriormente, es un regulador clave del ciclo celular promoviendo la transición G1/S a través de la fosforilación de la proteína RB (Figura 1.17). Se han detectado mutaciones recurrentes en el gen *CDK4* tanto en la línea germinal de familias con predisposición a melanoma como en los propios tumores. Estas mutaciones afectan frecuentemente a un residuo arginina conservado localizado en el codón 24 que es esencial en la interacción de CDK4 con p16^{INK4a}, por lo que esta mutación hace que p16^{INK4a} no pueda unirse e inactivar a CDK4, promoviendo así la progresión de G1 a S (Wölfel *et al.*, 1995; Zuo *et al.*, 1996; Coleman *et al.*, 1997).

RB1

Los portadores de mutaciones inactivadoras del gen *RB1* en la línea germinal presentan un riesgo entre 4 y 80 veces superior que la población general de desarrollar melanoma (Fletcher *et al.*, 2004). Este hecho, junto con la existencia de mutaciones que afectan a *CDKN2A* y a *CDK4* pone de manifiesto la gran importancia de la inactivación de la vía de retinoblastoma para el desarrollo de melanoma.

MC1R

MC1R es un gen localizado en el cromosoma 16q24.3 que codifica para un receptor de siete segmentos transmembrana localizado en la membrana plasmática de los melanocitos que está

acoplado a proteínas G. Como hemos descrito en el apartado 1.2.2.1 de esta memoria, en respuesta a la unión de su ligando, α -MSH, este receptor activa a adenilato ciclasa, lo cual produce un incremento en los niveles de AMPc que conduce a la inducción de la expresión del factor de transcripción MITF que, a su vez, induce la expresión de las enzimas necesarias para la síntesis de eumelanina (Figura 1.12) (Schaffer *et al.*, 2001). Se han identificado más de 75 variantes no sinónimas del gen *MC1R* que determinan el fenotipo de pigmentación de la piel en humanos (Sturm, 2002). Siete de estas variantes del gen (D84E, R142H, R151C, I155T, R160W, R163Q y D294H) dan lugar a receptores con una función disminuida y confieren un riesgo moderado de desarrollar melanoma. Además, estas variantes se han asociado con el fenotipo de piel clara cabello pelirrojo y pecas (Raimondi *et al.*, 2008).

Otras vías moleculares implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma

En las últimas décadas se han descubierto múltiples genes y vías moleculares cuyas alteraciones a nivel somático están implicadas en el desarrollo y progresión del melanoma. Además de impulsar el desarrollo de melanoma esporádico, la adquisición de algunas de estas alteraciones puede facilitar el desarrollo de melanoma hereditario en aquellos casos en los que existe alguna mutación germinal.

- Vía de las MAPK

La vía de señalización de las MAPK (acrónimo del inglés *mitogen-activated protein kinases*) regula el crecimiento, la supervivencia y la invasión celular, por ello está implicada en el desarrollo de un amplio espectro de cánceres. Esta vía se inicia en la membrana celular, bien por la unión de los receptores tirosina quinasa (RTKs) a sus ligandos o bien por la adhesión de las integrinas a la matriz extracelular, los cuales transmiten señales activadoras a través de la proteína RAS que es una GTPasa situada en la cara interna de la membrana celular. En su estado activado, RAS se encuentra unida a GTP y es capaz de unirse y activar a proteínas efectoras que conducen a la proliferación, diferenciación y supervivencia a través de la activación de varias vías de señalización. Las proteínas efectoras de RAS mejor caracterizadas son RAF y PI3K (Giehl, 2005). Cuando RAS está activada recluta a la membrana a la proteína quinasa RAF y la activa. Ésta proteína fosforila y activa a la proteína MEK 1/2 que, a su vez, fosforila a la proteína ERK 1/2. Ésta última transmite señales proliferativas o de supervivencia a través de la fosforilación de diversas dianas (Kohno y Pouyssegur, 2006) citoplasmáticas como la proteína ribosomal de supervivencia p90rsk y la proteína antiapoptótica Bcl-2, dianas del citoesqueleto como las MAP2/4 y factores de transcripción nucleares como c-MYC, c-FOS e HIF-1 α . Adicionalmente, RAS se une y activa a PI3K que conduce a la activación de la vía de AKT, impidiendo así la apoptosis (Figura 1.18).

RAS

Las mutaciones en la familia de protooncogenes *RAS*, que comprende *H-RAS*, *K-RAS* y *N-RAS*, son muy frecuentes en los diferentes cánceres humanos. Estas mutaciones típicamente afectan a los codones 12, 13 o 61 y mantienen a RAS en un estado constitutivamente activo (Barbacid, 1987). Aunque *K-RAS* es el más frecuentemente mutado en las neoplasias humanas, en melanoma, prácticamente todas las mutaciones en *RAS* afectan a *N-RAS*, siendo la mutación Q61R la más frecuente. Este gen se encuentra mutado en el 15% de los melanomas cutáneos (Ball *et al.*, 1994). En modelos de ratón se ha visto que la mutación en *RAS* como único evento es insuficiente para generar melanomas. Sin embargo, cuando se introducen mutaciones en *N-RAS* en ratones con deficiencia en

CDKN2A se desarrollan melanomas con un corto periodo de latencia y una alta penetrancia, dando lugar a metástasis en ganglios linfáticos hígado o pulmón en el 30% de los casos (Ackermann *et al.*, 2005).

RAF

La familia de Serina/Treonina quinasas RAF incluye tres proteínas ARAF, BRAF y CRAF. El 66% de los melanomas malignos presentan mutaciones somáticas en *BRAF*. La sustitución V600E es la mutación más frecuente y supone el 80% de las mutaciones en BRAF (Davies *et al.*, 2002). Sin embargo, también se han encontrado mutaciones activadoras de BRAF en el 82% de los *nevi* benignos, sugiriendo que la activación de BRAF es un evento mutacional temprano que, por sí mismo, no es suficiente para la transformación maligna (Pollock *et al.*, 2003). En melanocitos, la mutación en *BRAF*, como único evento, conduce a una proliferación celular inicial que da lugar a la formación de *nevi* y, posteriormente, a un arresto del crecimiento y a la inducción de senescencia mediada por p16^{INK4a}. La pérdida de p16^{INK4a} ocurre posteriormente con la progresión tumoral (Michaloglou *et al.*, 2005).

Aunque las mutaciones en *TP53* son poco frecuentes en melanoma, la vía de p53 está inactivada en melanoma debido a la pérdida del locus *CDKN2A* que afecta a p14^{ARF} que, en condiciones normales, conduce a la estabilización de p53 al inducir la degradación de Mdm2 ante una estimulación oncogénica, la pérdida de pRB o el daño al ADN (Chang *et al.*, 2007). La deficiencia en p14^{ARF} elimina la senescencia e incrementa la susceptibilidad a la transformación maligna (Castresana *et al.*, 1993). De acuerdo con esto, se ha visto que los ratones transgénicos con expresión de *BRAF*^{V600E} restringida a los melanocitos desarrollan hiperplasias melanocíticas benignas con características histológicas de *nevi* y evidencias bioquímicas de senescencia. Sin embargo, cuando estos ratones se cruzan con ratones transgénicos que carecen de *CDKN2A* afectando a p16^{INK4a} y p19^{ARF} (homólogo a p14^{ARF} en humanos) o de *TP53*, la descendencia desarrolla melanoma con una elevada incidencia, un corto periodo de latencia y se producen metástasis a pulmón y ganglios linfáticos (Goel *et al.*, 2009). Estos hallazgos ponen de manifiesto la cooperación entre las alteraciones de la vía de las MAPK, la vía de RB y la vía de p53 en el desarrollo del melanoma.

En células de melanoma humano, el silenciamiento génico de *BRAF*^{V600E} inhibe la activación de la vía de las MAPK y conduce al arresto del crecimiento, a la apoptosis y a la reversión del fenotipo maligno. Estos estudios, además de apoyar el papel oncogénico de las mutaciones en *BRAF* en el desarrollo del melanoma, sugieren el potencial beneficio terapéutico de la inhibición de BRAF en melanoma (Hingorani *et al.*, 2003).

En la inmensa mayoría de los casos, las mutaciones en *N-RAS* y *BRAF* no coexisten en un mismo melanoma, lo que sugiere que la activación de la vía de las MAPK en un solo punto es suficiente para la inducción de la proliferación/tumorigénesis (Kumar *et al.*, 2003).

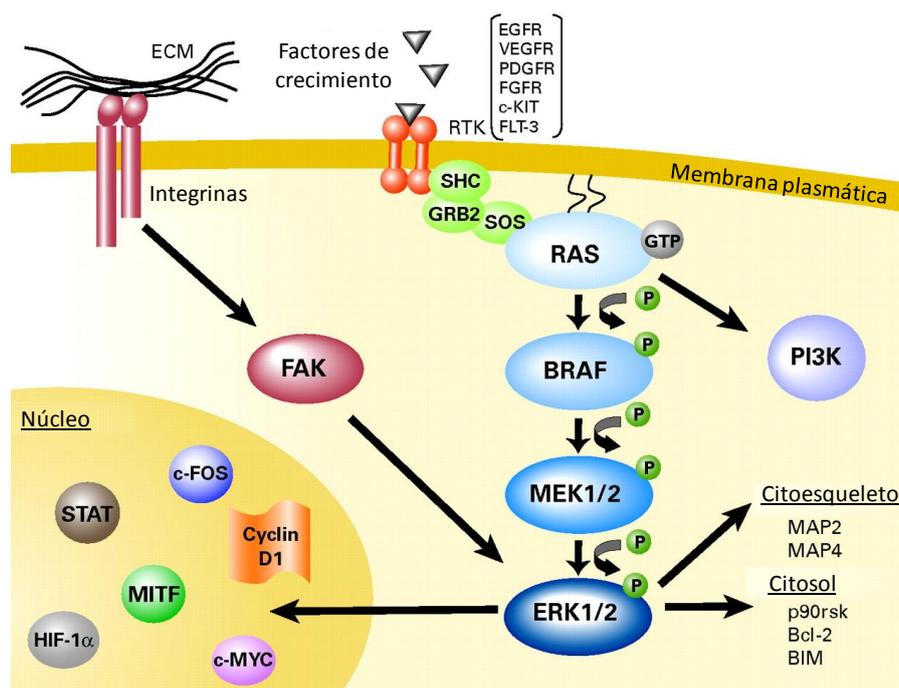


Figura 1.18. Esquema de la vía de señalización de las MAPK y sus dianas nucleares y citoplasmáticas.

- Vía del Retinoblastoma

Como se ha descrito anteriormente, las mutaciones germinales en *CDKN2A*, en *CDK4* y en *RB1* confieren susceptibilidad hereditaria a padecer melanoma familiar. Sin embargo, las mutaciones en estos genes son relativamente raras en los casos de melanoma esporádico. En estos casos se ha descrito que un 75% de los melanomas muestran evidencias de silenciamiento de $p16^{\text{INKa}}$ por hipermetilación del promotor (Marini *et al.*, 2006). Además, en el melanoma esporádico el descenso en los niveles de expresión de $p16^{\text{INKa}}$ se correlaciona con la progresión de la enfermedad, el aumento de la proliferación celular y un peor pronóstico (Grover *et al.*, 1998; Straume *et al.*, 2000). También, se ha observado en melanomas esporádicos un aumento de la expresión de *CDK6* y amplificación de *CDK4* y de *CCND1* que codifica para la ciclina D1.

- Vía de p53

La vía de p53 está frecuentemente inactivada en los cánceres humanos. Sin embargo, mientras que la mayoría de tumores neutralizan esta vía supresora tumoral directamente a nivel de *TP53*, las mutaciones en este gen son poco frecuentes en melanoma. Se piensa que esto se debe a que en melanoma se produce una inactivación funcional de p53 por medio de la pérdida del locus *CDKN2A*. También se han descrito amplificaciones de *MDM2* en el 3-5% de los melanomas (Muthusamy *et al.*, 2006).

- Vía de PI3K/AKT

La vía de PI3K es una de las rutas de señalización más comúnmente alteradas en los tumores humanos. Esta enzima consta de una subunidad reguladora p85 y de una subunidad catalítica p110 de las cuales existen varias isoformas que dan lugar a distintas clases de PI3K (I-III). La clase IA de PI3K comprende las subunidades $p110\alpha$, $p110\beta$ y $p110\delta$ y se activa en respuesta a la activación de

receptores con actividad tirosina quinasa, bien por interacción directa de los dominios SH2 de la subunidad p85 con residuos fosfotirosina del receptor o de proteínas adaptadoras como las IRS, o bien por interacción directa de p110 con RAS. La clase IB de PI3K comprende a la subunidad p110y y se activa en respuesta a la activación de receptores acoplados a proteínas G (Arcaro y Guerreiro, 2007). Una vez activada, la enzima PI3K fosforila al fosfatidil inositol-4,5-bifosfato (PIP₂) a fosfatidil inositol-3,4,5-trifosfato (PIP₃) que es el segundo mensajero de esta vía. Este PIP₃ recluta en la membrana a Akt, que es el efector principal de esta ruta, donde es fosforilada por PDK1 en la Thr308 (situada en el dominio catalítico). La fosforilación de este residuo es esencial para la activación de la enzima ya que produce un cambio conformacional que abre el centro activo pero, para una activación completa, se requiere además la fosforilación en el residuo Ser473, situado en la cola C-terminal, por parte de la PDK2. Tras su activación, Akt promueve la supervivencia, el crecimiento y la proliferación celular mediante la fosforilación de diversos sustratos en el citosol y en el núcleo. Los encargados de apagar la señalización a través de esta vía son la proteína fosfatasa PTEN (acrónimo del inglés *phosphatase and tensin homologue*), que desfosforila el PIP₃ a PIP₂, contrarrestando el efecto de PI3K, y la proteína fosfatasa 2A (PP2A) que actúa desfosforilando a Akt en la Thr308 (Figura 1.19) (Fresno-Vara *et al.*, 2004).

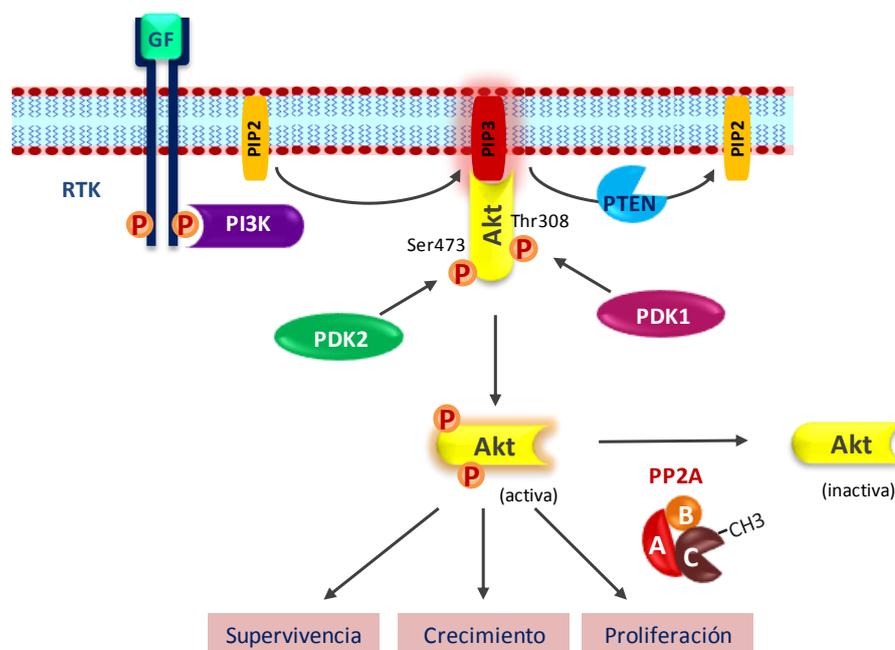


Figura 1.19. Esquema de la vía de señalización de PI3K/AKT.

En melanoma raramente se detectan mutaciones en *PIK3CA* (gen que codifica la subunidad p110 α). Éstas se encuentran en menos del 1% de los melanomas primarios y en el 3% de las metástasis (Omholt *et al.*, 2006) y no hay evidencias de amplificación de los genes de ninguna de las subunidades de PI3K mediante array CGH (Curtin *et al.*, 2005).

Sin embargo, entre el 30 y el 50% de los melanomas esporádicos presenta pérdidas de material genético en el brazo largo del cromosoma 10. Además, el 30% de los melanomas presenta pérdida de heterocigosidad en este cromosoma. Dado que *PTEN* está localizado en 10q23 se ha postulado que la inactivación de este gen podría jugar un papel importante en la tumorigénesis del melanoma (Stahl *et al.*, 2003). A pesar de ello, aunque se han encontrado mutaciones o deleciones de este gen en el

40% de las líneas celulares de melanoma, solo se han identificado mutaciones inactivadoras en el gen *PTEN* en el 10% de los melanomas sin cultivar (Reifenberger *et al.*, 2000; Birck *et al.*, 2000). Estas observaciones llevaron a especular que la inactivación de *PTEN* podría estar ocurriendo predominantemente mediante mecanismos distintos de la mutación. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que una alta proporción de melanomas presentan silenciamiento epigenético de *PTEN* mediante metilación del promotor (Zhou *et al.*, 2000; Mirmohammadsadegh *et al.*, 2006). En conjunto, se piensa que en el 40% de los melanomas hay una inactivación funcional de *PTEN* bien mediante mutación, bien mediante delección o bien mediante silenciamiento epigenético.

Se ha visto que las alteraciones en *PTEN* se asocian con mutaciones activadoras en *BRAF* pero no en *N-RAS* (Tsao *et al.*, 2004). Esto es consistente con el hecho de que *N-RAS* activa tanto la cascada de las MAPK como la vía de PI3K, eliminando así la necesidad de alteraciones adicionales en la vía de PI3K en melanomas con mutación en *N-RAS*. En cuanto a Akt, aunque no se han detectado mutaciones activadoras, se ha detectado sobreexpresión de la isoforma Akt3 en melanomas primarios como consecuencia de la baja actividad de *PTEN* (Stahl *et al.*, 2004). Por último, el aumento de los niveles de fosfo-Akt se ha asociado con la progresión tumoral y con una baja tasa de supervivencia (Meier *et al.*, 2005).

- Reguladores del linaje melanocítico

MITF

El factor de transcripción MITF es el regulador clave del desarrollo, diferenciación, función y supervivencia de los melanocitos. Consiste en un dominio básico de unión al ADN, un dominio hélice-bucle-hélice y un dominio de cremallera de leucinas para la homo y heterodimerización (Steingrimsson *et al.*, 2004). Existen al menos nueve isoformas de MITF, de las cuales, la isoforma MITF-M se expresa de forma selectiva en los melanocitos debido a la presencia de un promotor específico de este tipo celular. La expresión de este factor de transcripción en determinadas células precursoras no pigmentadas de la cresta neural (melanoblastos) es el punto crítico que las compromete para su diferenciación hacia el linaje melanocítico y es esencial en el desarrollo de los melanocitos (Goding, 2000). MITF induce la transcripción de genes importantes para la producción de melanina, incluyendo Tirosinasa (*TYR*), Proteína relacionada con la tirosinasa (*TYRP1*) y Dopacromo tautomerasa (*DCT*) (Widlund y Fisher, 2003). La expresión de MITF es inducida por la vía Wnt a través de Lef1 y β -catenina, así como por la α -MSH vía AMPc, por la activación de c-KIT vía MAPK y por la vía de gp130 (Figura 1.20) (Widlund y Fisher, 2003; Steingrimsson, *et al.*, 2004).

Los datos acerca del papel de MITF en el desarrollo del melanoma son contradictorios. Por una parte, niveles bajos de expresión de MITF se han correlacionado con un peor pronóstico, sugiriendo que melanomas más diferenciados con mayores niveles de MITF tendrían un fenotipo menos agresivo (Salti *et al.*, 2000). Esta hipótesis fue validada *in vitro* cuando la sobre-expresión de *MITF-M* en una línea celular altamente agresiva demostró la inducción de un fenotipo menos agresivo (Lekmine *et al.*, 2007). Por otra parte, existen evidencias contrapuestas que apuntan a que este factor de transcripción podría tener un papel oncogénico en melanoma. De hecho, se ha detectado amplificación de este gen en el 10% de los melanomas primarios y en el 20% de los melanomas metastásicos, mientras que no se detectan amplificaciones de este gen en *nevi* benignos. Esta amplificación de MITF se correlaciona con una menor supervivencia global. Además, aunque con frecuencia la expresión de muchos marcadores melanocíticos se pierde en melanoma, la expresión

de *MITF* normalmente se conserva, sugiriendo que este factor de transcripción podría ser particularmente importante en el mantenimiento del melanoma (Chang y Folpe, 2001).

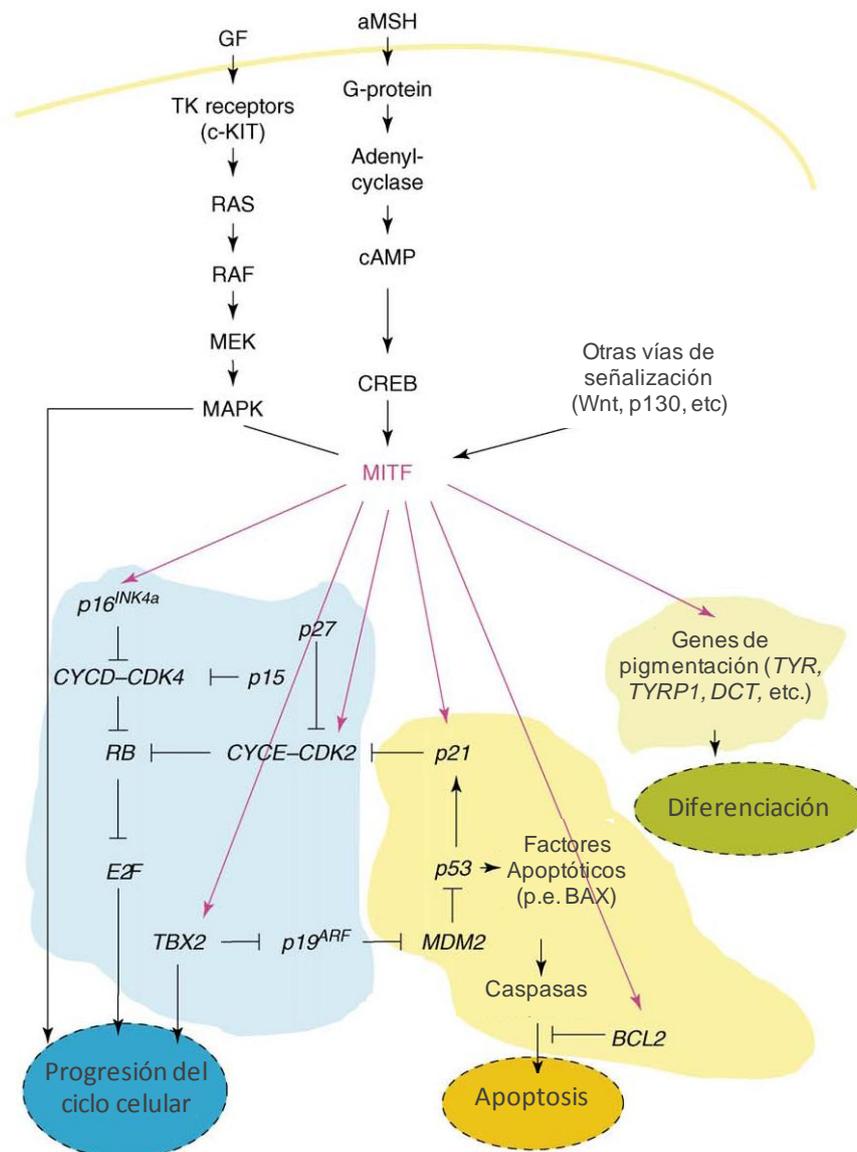


Figura 1.20. Vías de señalización implicadas en la regulación de MITF y regulación de los procesos de progresión en el ciclo celular, apoptosis y diferenciación por este factor de transcripción mediante la inducción de sus genes diana (flechas de color lila).

Estudios recientes han puesto de manifiesto que MITF actuaría como un reóstato que determinaría la identidad de las distintas subpoblaciones celulares coexistentes en el interior de un melanoma. Por un lado, una expresión reducida de MITF conduciría a un arresto de las células de melanoma en fase G1, mediado por p27^{KIP1}. Estas células tendrían un fenotipo invasivo y exhibirían propiedades de célula madre, incluyendo la capacidad de iniciar tumores con una alta eficiencia (Carreira *et al.*, 2006; Cheli *et al.*, 2011; Pinner *et al.*, 2009).

En el polo opuesto, niveles elevados de MITF conducirían al arresto del ciclo celular en fase G1 mediado por p16^{INK4a} y p21^{CIP1} y a la inducción de genes de diferenciación que conducirían a la síntesis de melanina y a la biogénesis de melanosomas (Carreira *et al.*, 2005; Cheli *et al.*, 2010; Loercher *et al.*, 2005). Entre ambos extremos, aquellas células con niveles intermedios de MITF tendrían capacidad proliferativa (Carreira *et al.*, 2005; Wellbrock *et al.*, 2008). Según este modelo, el intercambio entre estos fenotipos sería un proceso dinámico dependiente del nivel de expresión de este factor de transcripción (Figura 1.21).

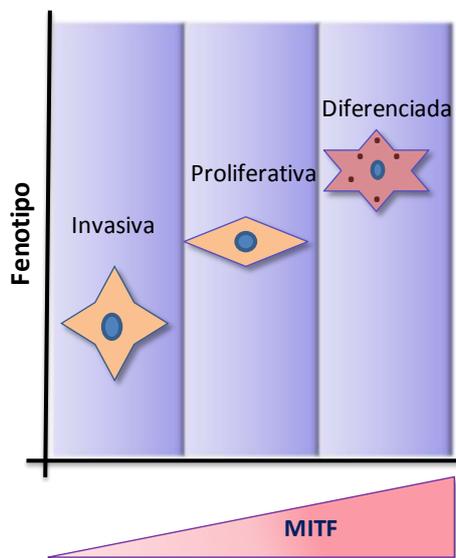


Figura 1.21. Modelo de MITF como reóstato cuyos niveles determinan el fenotipo de las células de melanoma.

Este modelo del reóstato proporciona un marco para comprender el papel de MITF en la progresión del melanoma y en el desarrollo melanocítico y concilia los papeles pro y antiproliferativos de MITF. Sin embargo, se piensa que la modulación precisa de la actividad de MITF estaría determinada por las modificaciones postraduccionales de este factor de transcripción en cada momento, dependiendo del microambiente tumoral. De hecho, diversos estudios han puesto de manifiesto que la actividad de este factor de transcripción, está estrechamente regulada postraduccionalmente mediante fosforilación, acetilación, ubiquitinación y sumoilación.

cKIT

El gen *cKIT* codifica para un receptor tirosina quinasa cuyo ligando es el SCF (acrónimo del inglés *stem cell factor*). Entre los efectores de la proteína cKIT se encuentran las cascadas de las MAPK, PI3K, la fosfolipasa C, la quinasa Src y el factor de transcripción MITF, por lo que la señalización a través de este receptor es esencial en el desarrollo, la diferenciación, la proliferación, la supervivencia y la migración del linaje melanocítico (Hemesath *et al.*, 1997; Grichnik *et al.*, 2006). Se han descrito mutaciones activadoras y/o amplificaciones génicas en el 39% de los melanomas de mucosas, el 36% de los melanomas acrales y en el 28% de los melanomas de piel sometida a daño solar crónico (Curtin *et al.*, 2006). Las mutaciones suelen afectar a la región yuxtamembranosa del receptor, siendo la mutación L576P en el exón 11 la más frecuente (Beadling *et al.*, 2008). Muchas de las mutaciones en *cKIT* presentes en melanoma son mutaciones oncogénicas observadas en otros tipos de cáncer que inician una serie de eventos de señalización que resultan en proliferación celular

y propagación del cáncer (Webster *et al.*, 2006). Estudios preclínicos *in vitro* con células de melanoma que presentan *ckIT* mutado han demostrado que el Imatinib, un inhibidor de tirosina quinasa, inhibe la proliferación, induce apoptosis y disminuye la señalización de las vías MAPK, PI3K/Akt y STAT.

- Reguladores de la apoptosis

BCL2

Como se ha descrito en el apartado 1.1.3.3 de esta memoria, la familia de proteínas Bcl-2 son reguladores clave de la vía de apoptosis mitocondrial. Esta familia de proteínas incluye miembros antiapoptóticos y miembros proapoptóticos. En melanoma, las alteraciones en la ruta mitocondrial de apoptosis y las proteínas Bcl-2 tienen una gran importancia en la determinación de la resistencia a la apoptosis y en la quimio resistencia de este tipo tumoral. Por una parte, el 90% de los melanomas malignos muestran elevados niveles de expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 (Jensen *et al.*, 2007). Estos niveles elevados de Bcl-2 permitirían a las células de melanoma sobrevivir bajo las condiciones ambientales adversas que podrían encontrar durante el desarrollo de metástasis, además de permitirles aumentar su resistencia a la quimioterapia, la radioterapia, e incluso se frente a las respuestas inmunes anticancerígenas. De hecho, experimentos *in vitro* han demostrado que el silenciamiento genético de *BCL2* es capaz de potenciar el efecto de los fármacos anticancerígenos y de sensibilizar a las células de melanoma frente a la destrucción por el sistema inmune (Jansen *et al.*, 1998; Huang, 2000; Lickliter *et al.*, 2007). A nivel clínico, la combinación de oblimersen, un oligonucleótido antisentido contra el ARNm de *BCL2*, con dacarbazina demostró un incremento significativo en la supervivencia libre de progresión y en la tasa de respuesta global en pacientes con melanoma en estadios avanzados (Bedikian *et al.*, 2006). También se han desarrollado inhibidores de molécula pequeña capaces de unirse a Bcl-2 en el surco de unión a las proteínas proapoptóticas *BH3-only* y desplazarlas, permitiendo que éstas interaccionen con Bax y Bak y desencadenen la señal proapoptótica. Estos inhibidores están siendo investigados en ensayos preclínicos (Lickliter *et al.*, 2007).

APAF1

Como se ha descrito en el apartado 1.1.3.3 de esta memoria, APAF-1 es un regulador clave de la vía de apoptosis mitocondrial. Se trata del elemento central del apoptosoma cuya formación se desencadena con la liberación de la mitocondria del citocromo c mediada por miembros de la familia Bcl-2. Una vez que APAF-1 se ha unido al citocromo c, este primer complejo se une a la procaspasa 9 en presencia de ATP y favorece su activación autocatalítica. Esta caspasa iniciadora, inicia la cascada de caspasas efectoras que culminará con la desintegración coordinada de la célula (Li *et al.*, 1997). Se ha descrito que el 52% de las líneas celulares procedentes de melanomas metastásicos y el 42% de los melanomas metastásicos presentan bajos niveles de expresión de *APAF1* que se asocia a una pérdida alélica de este gen (Soengas *et al.*, 2001). APAF-1 es un efector de p53 en la apoptosis inducida por daño al ADN, por lo que la pérdida de APAF-1 disminuye dramáticamente la apoptosis dependiente de p53 y facilita la transformación oncogénica (Soengas *et al.*, 1999; Kannan *et al.*, 2001). De hecho, se ha comprobado que la reexpresión de este gen en células de melanoma con bajos niveles de APAF-1 es capaz de sensibilizarlas frente a la doxorubicina y otros agentes quimioterapéuticos (Dai *et al.*, 2004).

1.2.2.7. Diagnóstico del melanoma

La detección del melanoma en un estadio temprano de su evolución es de crucial importancia dado que el pronóstico de esta enfermedad está directamente relacionado con la profundidad de la lesión. Durante los últimos treinta años, se ha producido una significativa mejora en el diagnóstico del melanoma en estadios tempranos y curables de la enfermedad.

En 1985, investigadores del *Melanoma Cooperative Group* de la Universidad de Nueva York idearon el **criterio "ABCD"** como una regla simple que podía ser utilizada tanto por las "personas de a pie" como por los médicos de atención primaria para la identificación temprana del melanoma. Según esta regla, los melanomas son **Asimétricos** (no pueden dividirse en dos mitades iguales), presentan **Bordes irregulares**, el **Color** varía de un área a otra de la lesión (tonos bronce, café o negro, e incluso a veces blanco, rojo o azul) y tienen un **Diámetro** superior a 6 mm (Friedman *et al.*, 1985). Posteriormente se añadió la letra **E** a esta regla, para hacer referencia a la **Evolución**, es decir, al cambio de la lesión con el tiempo (Figura 1.22). Se han descrito, aunque en una baja proporción, melanomas con un diámetro igual o inferior a 6 mm, por lo que se recomienda realizar un seguimiento de la evolución de la lesión si se detecta al menos uno de los criterios ABC (Abbasi *et al.*, 2004).

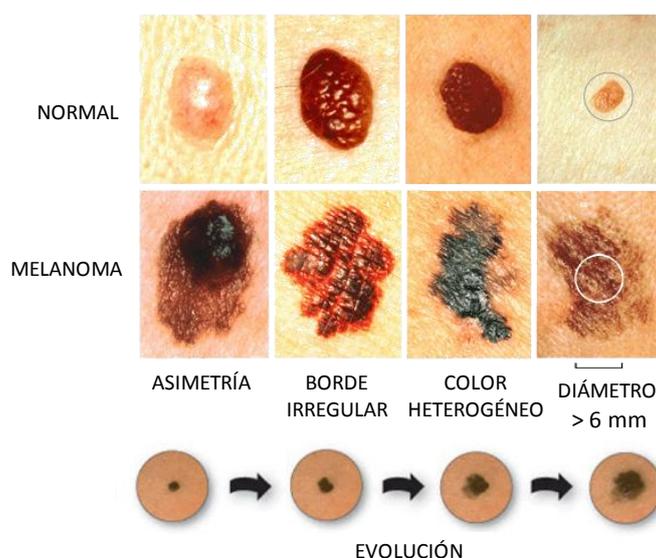


Figura 1.22. Regla ABCDE para el diagnóstico del melanoma.

En base a la regla ABCDE se pueden diagnosticar correctamente el 65-80% de los melanomas. Sin embargo, algunos melanomas se manifiestan de forma clínicamente inocente y pueden pasar desapercibidos a los ojos del experto por lo que se necesitan pruebas adicionales:

Dermatoscopia o microscopía de epiluminiscencia: es una sencilla técnica no invasiva de microscopía *in vivo* que nos permite visualizar estructuras microscópicas no apreciables a simple vista. Esta técnica es capaz de mejorar la precisión diagnóstica del melanoma entre un 5-30% sobre la inspección clínica (Vestergaard *et al.*, 2008).

Microscopía confocal in vivo: es una tecnología no invasiva que permite examinar la piel en múltiples planos horizontales y a profundidades variables con una resolución que permite observar la

arquitectura tisular, celular e incluso nuclear de la epidermis, así como de las estructuras dérmicas subyacentes. La interpretación de las imágenes de las estructuras microanatómicas se asemeja a la evaluación histopatológica. De esta forma se logra realizar un análisis microscópico de la piel sin necesidad de extirpar tejido, lo que supone un avance en la investigación, en el diagnóstico no invasivo y en la monitorización de los tratamientos (Rigel *et al.*, 2010).

Biopsia de piel: constituye la toma de una muestra de la piel afectada para su estudio anatomopatológico. Esta biopsia se puede realizar por raspado (se toman las capas superiores de la piel), por punción (se extrae un cilindro que incluye las capas profundas de la piel) o por incisión (se toma con un bisturí una muestra de la lesión que incluya el espesor completo de la piel). Pero lo más común es la biopsia escisional que supone la extracción de toda la lesión tumoral con un bisturí.

Una vez que un melanoma ha sido diagnosticado, se realizan pruebas adicionales para determinar si las células cancerosas se han diseminado dentro de la piel o a otras partes del cuerpo:

Biopsia del ganglio linfático centinela: dado que esta neoplasia se disemina preferentemente por vía linfática, los ganglios linfáticos regionales constituyen la localización inicial más común de las metástasis del melanoma cutáneo. En la mayoría de los casos, estas metástasis suelen estar limitadas al primer ganglio que recoge el drenaje linfático del tumor, denominado “ganglio centinela”. Para localizarlo, en primer lugar, se inyecta un marcador que puede ser una sustancia radiactiva (Tc99-nanocoloide) o un colorante (azul de metileno) por vía intradérmica en el tumor o en la piel pericatricial de la biopsia escisional. El ganglio centinela se localiza como el correspondiente al primer lugar de acumulación persistente del marcador. Tras la extirpación quirúrgica del ganglio centinela, éste se fija en formalina, se embebe en parafina y se realizan diversas secciones que serán analizadas mediante un estudio histopatológico rutinario con hematoxilina-eosina, e inmunohistoquímico para S-100, PMEL17 (acrónimo del inglés *melanocyte protein 17*) y MART-1 (acrónimo del inglés *melanoma antigen recognized by T-cells 1*) para determinar la presencia de células de melanoma (Morton *et al.*, 2006).

Tomografía axial computarizada (TAC): es una técnica de imagen que utiliza radiación X para obtener cortes o secciones tridimensionales muy precisas del interior del cuerpo con fines diagnósticos. En lugar de obtener una imagen de proyección, como la radiografía convencional, la TAC obtiene múltiples imágenes ya que la fuente de rayos X y los detectores de radiación efectúan movimientos de rotación alrededor del cuerpo. Finalmente, la imagen tomográfica se obtiene mediante algoritmos matemáticos que reconstruyen la imagen tridimensional a partir de múltiples imágenes axiales planas. En algunas ocasiones es necesario el uso de contrastes radiológicos intravenosos u orales para ver la función de determinados órganos.

Imágenes por resonancia magnética (MRI): es una técnica de obtención de imágenes del interior del cuerpo mediante el uso de ondas de radio e imanes potentes. En algunas ocasiones se utiliza un medio de contraste, el gadolinio, que se acumula alrededor de las lesiones cancerosas y las hace aparecer más brillantes en la imagen. Esta técnica es especialmente útil para examinar el cerebro y la médula espinal.

Tomografía por emisión de positrones (PET): es una técnica no invasiva de diagnóstico e investigación *in vivo* por imagen capaz de medir la actividad metabólica de los tejidos. Se basa en la detección de la distribución tridimensional que adopta en el interior del cuerpo la 2-[18F]-fluoro-2-

desoxi-D-glucosa (18F-FDG) que es un análogo de la glucosa marcado con flúor-18, un isótopo radiactivo emisor de positrones. La 18F-FDG, es incorporada principalmente por aquellas células con elevadas tasas de consumo de glucosa, como el cerebro, el corazón, el riñón y las células cancerígenas, donde es fosforilada impidiendo su salida al exterior celular. Dado que la FDG no puede ser metabolizada por las células, se produce su acumulación en estos tejidos y, como resultado, la distribución de 18F-FDG muestra qué áreas del cuerpo tienen un metabolismo glucídico elevado, que es una característica primordial de los tejidos neoplásicos. Esta técnica es extremadamente sensible (94.2%) en la identificación del melanoma metastásico, particularmente en tejidos blandos, ganglios linfáticos e hígado (Holder *et al.*, 1998).

1.2.2.8. Estadificación del melanoma

El sistema más frecuentemente utilizado para estadificar el melanoma es el establecido por el *American Joint Commission on Cancer* (AJCC). Este sistema se basa en el grosor de la lesión, la ulceración, la afectación ganglionar y la presencia de metástasis distantes:

Estadio 0 (melanoma <i>in situ</i>)	Las células de melanoma están confinadas a la epidermis y no se han extendido a capas más profundas de la piel.	
Estadio I	IA	El tumor no mide más de un milímetro de grosor, sin ulceración.
	IB	- No mide más de un milímetro de grosor y está ulcerado; o - mide más de uno pero no más de dos milímetros de grosor, sin ulceración.
Estadio II (afecta solamente a la piel y no hay afectación ganglionar ni metástasis distantes)	IIA	- Mide entre 1 y 2 mm de grosor y está ulcerado; o - mide entre 2 y 4 milímetros de grosor sin ulceración.
	IIB	- Mide entre 2 y 4 mm de grosor y está ulcerado; o - mide más de 4 mm de grosor, sin ulceración.
	IIC	El tumor tiene más de 4 mm de grosor y está ulcerado.
Estadio III (el tumor puede tener cualquier grosor; hay afectación locorregional)	IIIA	El melanoma se ha extendido hasta 3 ganglios linfáticos cercanos al tumor primario, pero los ganglios no están agrandados y las células solo pueden ser detectadas al microscopio (micrometástasis). El melanoma no está ulcerado, ni existen metástasis a distancia.
	IIIB	- El melanoma se ha ulcerado y se ha extendido hasta a 3 ganglios linfáticos pero los ganglios no están agrandados y las células solo pueden verse al microscopio; o - el melanoma no está ulcerado pero se ha extendido a hasta 3 ganglios linfáticos cercanos y éstos están agrandados; o - el melanoma no está ulcerado y se ha extendido a pequeñas aéreas próximas de la piel (satelitosis) o vasos linfáticos cercanos, pero no hay células de melanoma en los ganglios

	linfáticos cercanos.
Estadio IV (melanoma metastásico)	El melanoma se ha diseminado hasta otras partes del cuerpo. Los lugares de metástasis más comunes son el pulmón, el hígado, el cerebro y también ganglios linfáticos distantes o áreas de piel alejadas del tumor primario.

1.2.2.9. Tratamiento del melanoma

Cirugía

El primer paso en el tratamiento del melanoma suele ser la cirugía para extirpar el tumor primario. En aquellos casos en los que el diagnóstico se realizó mediante biopsia escisional, suele ser necesario ampliar los márgenes quirúrgicos para reducir al máximo las probabilidades de recidiva. El margen de tejido sano varía en función del estadio, siendo de 0.5 cm en el estadio 0; 1 cm en el estadio I; 2 cm en estadio IIA y IIB; y 2-3 cm del estadio IIC en adelante. A partir del estadio I se recomienda realizar biopsia de ganglio centinela para descartar afectación ganglionar locorregional. Cuando existen adenopatías palpables o ganglio centinela positivo (estadio III) se debe realizar linfadenectomía terapéutica. Del mismo modo, si existen metástasis cutáneas regionales (satelitos) y son resecables, se debe proceder a su extirpación con márgenes de seguridad. En el estadio IV se puede realizar cirugía en aquellos casos con metástasis únicas o en pequeño número, dependiendo de su localización.

Radioterapia

La radioterapia utiliza radiación ionizante (fundamentalmente rayos X o rayos gamma) para destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia puede ser externa, interna o sistémica. En la radioterapia externa, la radiación proviene de una maquina colocada fuera del cuerpo, mientras que, en la radioterapia interna la fuente de radiación está sellada en un portador pequeño llamado implante que se coloca muy cerca del tumor o dentro del mismo. Estos implantes pueden ser alambres, catéteres, cintas, cápsulas o semillas. Por último, en la radioterapia sistémica se utilizan materiales radiactivos no sellados como el yodo 131 y el estroncio 89 que pueden ingerirse o ser inyectados, para ser distribuidos a todo el organismo. El tipo de radiación que se administra depende del tipo de cáncer, de su ubicación y de la profundidad en el cuerpo a donde se necesita que llegue la radiación, entre otros factores.

En el caso del melanoma, la radioterapia está indicada en los lentigos malignos en los cuales está contraindicada la cirugía. Además, se suele administrar radioterapia externa después de la linfadenectomía, en el área donde fueron extirpados los ganglios linfáticos, con el objetivo de tratar de reducir la probabilidad de que el cáncer regrese. También se puede usar para tratar el melanoma que ha recurrido después de la cirugía, ya sea en la piel o en los ganglios linfáticos. Por último se puede administrar radioterapia para aliviar los síntomas causados por las metástasis, especialmente cerebrales y óseas (Oxenber *et al.*, 2014).

Inmunoterapia

La inmunoterapia, también llamada terapia biológica o bioterapia, hace referencia al conjunto de estrategias terapéuticas capaces de estimular la capacidad del sistema inmune del paciente para reconocer y destruir a las células tumorales con mayor eficacia. En la actualidad, existen varios tipos de inmunoterapia en el tratamiento del melanoma:

- Terapia con citoquinas:

La **interleuquina-2 (IL-2)** es una citoquina secretada principalmente por los linfocitos T *helper* tras su activación capaz de estimular la activación de otras células del sistema inmunológico como los linfocitos T citotóxicos y las células NK, que son esenciales en la respuesta inmunitaria contra el cáncer. El uso de IL-2 en altas dosis fue aprobado por la FDA para el tratamiento del melanoma metastásico en 1998 (Atkins *et al.*, 1999).

El **interferón alfa (IFN- α)** fue aprobado por la FDA en 2011 como terapia adyuvante tras la escisión del melanoma primario, para los pacientes con melanoma en estadios II y III con alto riesgo de recurrencia. Esto se debe a su capacidad de activar células inmunes como los macrófagos y estimular su capacidad de presentación de antígenos a los linfocitos T (Okuyama *et al.*, 2010; Tarhini *et al.*, 2012).

- Inhibidores de puntos de control inmunitarios para el melanoma avanzado

La activación de las células T se desencadena por la unión del receptor TCR (*T-cell receptor*) a un antígeno presentado en un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La unión de la proteína CD28 de la superficie de las células T a la proteína B7, expresada en la superficie de las células presentadoras de antígeno, supone una señal coestimuladora para la célula T. Esta activación resulta en la proliferación de la célula T y en la liberación de citoquinas que facilitan la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, tras la activación de la célula T, se ponen en marcha mecanismos de control, como la expresión de **CTLA-4** (acrónimo del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*), una proteína que compite con CD28 por la unión de B7 y transmite señales inhibitorias a la célula T (Figura 1.23). El Ipilimumab (Yervoy) es un anticuerpo monoclonal frente a la proteína CTLA-4 que ha demostrado un incremento en la actividad de las células T, seguido de una regresión tumoral y un aumento de la supervivencia global (Phan *et al.*, 2003; Hodi *et al.*, 2010). Así, en 2011 fue aprobado su uso para el tratamiento del melanoma en estadio IV no resecable.

Otro punto de control inmune es el constituido por **PD-1** (acrónimo del inglés *programmed cell death 1*), expresado en los linfocitos T citotóxicos, y sus ligandos PD-L1 y PD-L2, expresados en las células tumorales o en células presentadoras de antígeno. La expresión de PD-1 se induce en respuesta a la activación de las células T y su función es limitar la respuesta inflamatoria mediada por estas células para evitar respuestas autoinmunes. Se ha descrito la expresión de PD-1 y su ligando PD-L1 en el microambiente tumoral, indicando que esta vía podría tener un papel en la evasión del sistema inmune por parte de los cánceres humanos (Zou *et al.*, 2008). El Pembrolizumab (Keytruda) y el Nivolumab (Opdivo) son anticuerpos monoclonales dirigidos frente a PD-1 que se encuentran en distintas fases de desarrollo clínico y han demostrado inducir remisión tumoral y aumento de la supervivencia (Figura 1.23) (Topalian *et al.*, 2014; Robert *et al.*, 2014).

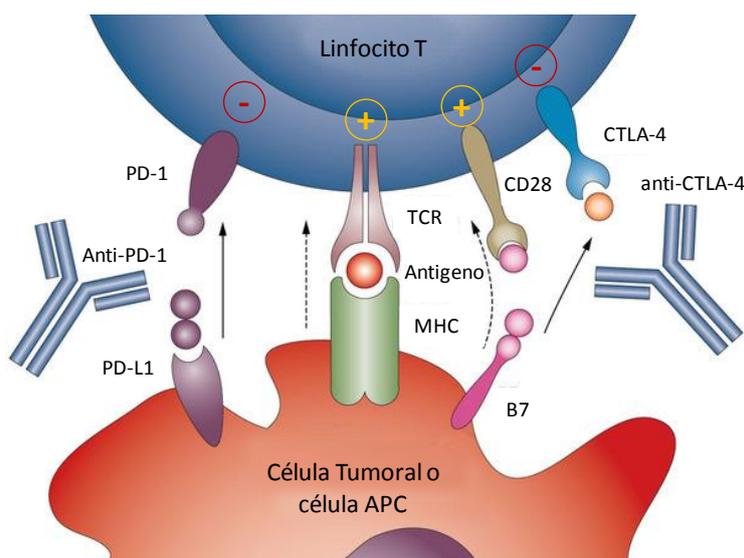


Figura 1.23. Mecanismo de regulación de la activación de los linfocitos T y anticuerpos frente a PD-1 y CTLA-4 como inhibidores de los puntos de control inmunitarios para el tratamiento del melanoma.

El **imiquimod** (Zyclara) es un medicamento que se aplica como una crema. Estimula la respuesta inmunitaria local contra las células cancerosas de la piel. Para los melanomas en etapa muy temprana (etapa 0), algunos médicos pueden utilizar imiquimod si la cirugía pudiera causar desfiguración. También se puede usar para algunos melanomas que se han propagado por la piel, pero no se utiliza para melanomas en estadios más avanzados.

- Transferencia de células T adoptivas:

Se trata de una aproximación por la cual, linfocitos T infiltrantes del tumor (TIL), que son linfocitos T citotóxicos que presentan una reactividad natural frente a las células tumorales, son cultivados, expandidos y manipulados *ex vivo* para después ser reintroducidos de nuevo en el paciente para ejercer una respuesta antitumoral. Esta infusión de células T se suele acompañar de la administración de altas dosis de IL-2 para estimular su expansión en el paciente. En muchos casos, estos TIL son modificados genéticamente para expresar receptores específicos tumorales o receptores de células T (TCR) dirigidos frente a antígenos tumorales específicos. Esta estrategia ha demostrado prometedores resultados preclínicos y está siendo probada actualmente en ensayos clínicos (Lee y Margolin, 2012; Urba, 2014).

- Vacunas:

Las vacunas contra el cáncer se basan en la hipótesis de que determinados péptidos constituyentes de las células neoplásicas, denominados antígenos asociados al tumor (TAA), pueden activar la respuesta inmune del hospedador para producir una respuesta inmune anticancerígena. En melanoma, antígenos como PMEL17, NY-ESO-1, MAGE y MART-1, así como lisados tumorales están siendo testados en ensayos clínicos con resultados esperanzadores (Aranda *et al.*, 2013).

Terapia dirigida contra dianas moleculares específicas

Los avances en la identificación de mutaciones somáticas implicadas en la patogénesis del melanoma han permitido el desarrollo de fármacos dirigidos frente a dianas moleculares específicas.

Como se ha descrito en el apartado 1.2.2.6. de esta memoria, el 60% de los melanomas cutáneos malignos presenta mutaciones en el gen *BRAF* que resultan en la activación constitutiva de la proteína quinasa BRAF que transmite señales de supervivencia y crecimiento a la célula tumoral a través de la vía de las MAPK. Entre el 80 y el 90% de estas mutaciones resultan en la sustitución de ácido glutámico por valina en el codón 600 (*BRAFV600E*), aunque se han descrito otras mutaciones activadoras (*BRAFV600K* y *BRAFV600R*). Se han desarrollado potentes inhibidores específicos de la forma mutada de BRAF como el vemurafenib o el dabrafenib que han mostrado mejores resultados que la quimioterapia clásica (dacarbazina) en cuanto a tasas de respuesta, supervivencia libre de progresión y supervivencia global en ensayos clínicos con pacientes con melanoma metastásico con *BRAF* mutado. Así, el vemurafenib y el dabrafenib fueron aprobados por la FDA en 2011 y en 2013, respectivamente, para el tratamiento del melanoma metastásico con la mutación *BRAFV600* (Hauschild *et al.*, 2012; McArthur *et al.*, 2014).

Dado que MEK es una quinasa que actúa aguas abajo de BRAF en la vía de las MAPK, esta proteína representa una excelente diana en tumores con *BRAF* mutado. Así, se han desarrollado inhibidores específicos frente a MEK1 y MEK2 como el trametinib que fue aprobado por la FDA en 2013 para su uso en pacientes con melanoma metastásico con las mutaciones *BRAFV600E* o *V600K* (Flaherty *et al.*, 2012).

Quimioterapia

La quimioterapia está indicada en el melanoma en estadio IV con metástasis múltiples, especialmente si éstas son sintomáticas. Los agentes quimioterapéuticos más utilizados para el tratamiento del melanoma avanzado son:

Dacarbazina: es un agente alquilante que actúa formando enlaces cruzados intra e intercatenarios en el ADN interfiriendo con la replicación y la transcripción del mismo. Fue aprobado por la FDA para su uso en el melanoma metastásico en 1970 y, a día de hoy, todavía constituye el agente quimioterapéutico estándar para esta enfermedad, con una tasa de respuesta global del 15 al 20% y una supervivencia libre de progresión de 5-6 meses, con solo un 5% de respuestas completas (Serrone *et al.*, 2000).

Temozolomida: es un agente alquilante análogo a la dacarbazina que ha demostrado unas tasas de respuesta global y de supervivencia similares a ésta. Se trata de un fármaco de administración oral que presenta una menor toxicidad que la dacarbazina y además atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo que se utiliza para el tratamiento y la prevención de las metástasis cerebrales (Middleton *et al.*, 2000).

Nitrosoureas como la carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) y fotemustina como agentes únicos han demostrado una actividad comparable con la dacarbazina, pero causan más mielosupresión y alopecia. La fotemustina tiene la ventaja de que atraviesa rápidamente la barrera hematoencefálica y ha demostrado una actividad superior a la dacarbazina en pacientes con metástasis cerebrales (Avril *et al.*, 2004).

Inhibidores de los microtúbulos: los vinca alcaloides como la vindesina y la vinblastina (inhibidores del ensamblaje de los microtúbulos) y los taxanos como el paclitaxel (inhibidores del

desensamblaje de los microtúbulos) presentan una modesta actividad en monoterapia en pacientes con melanoma metastásico (Bajetta *et al.*, 2002).

El **cisplatino y análogos** como el carboplatino son agentes alquilantes ampliamente utilizados en el tratamiento del cáncer. Sin embargo, en melanoma la efectividad de estos agentes en monoterapia es baja (Bathia *et al.*, 2009).

La escasa actividad antitumoral de los agentes quimioterapéuticos mencionados anteriormente en monoterapia, ha llevado al desarrollo de combinaciones de éstos para tratar de mejorar su efectividad. Un ejemplo es el régimen de Dartmouth que combina cisplatino, dacarbazina, carmustina y tamoxifeno (CDBT) o el régimen CVD que combina cisplatino, vinblastina y dacarbazina. Estos regímenes han mostrado un modesto aumento en las tasas de respuesta global, pero no un aumento significativo en la supervivencia global respecto a dacarbazina (Bathia *et al.*, 2009).

En la actualidad existen numerosos estudios que están desarrollando diversas combinaciones de agentes quimioterapéuticos, agentes biológicos y fármacos dirigidos contra dianas moleculares concretas cuyos resultados son prometedores.

Perfusión aislada de las extremidades

Consiste en pinzar e instalar cánulas en los vasos principales de las extremidades, conectarlos a un circuito extracorpóreo de oxigenación y administrar a través de éstos los medicamentos requeridos para alcanzar localmente niveles de quimioterapia 15 a 25 veces mayores que los niveles que se obtienen de manera sistémica. Hasta el momento, el agente más utilizado es el melfalán, aunque también se han utilizado dosis altas de TNF- α . Después de 1 a 2 horas de tratamiento, se lava la extremidad con solución salina normal, se retiran las cánulas y se reparan los vasos. En los últimos años se ha usado la hipertermia de la extremidad para aumentar la captación celular de la quimioterapia. Esta terapia se aplica en el tratamiento o la prevención de las metástasis en tránsito en las extremidades (Turley *et al.*, 2011).

1.3. FOLATOS Y ANTIFOLATOS

1.3.1. ÁCIDO FÓLICO

El ácido fólico (folato, en su forma aniónica), ácido pteroil-L-glutámico o vitamina B9, es una vitamina hidrosoluble necesaria para el desarrollo normal de los organismos (Assaraf, 2007; Scott, 1999). El ácido fólico no posee actividad coenzimática como tal, sino que el verdadero coenzima es su forma reducida, el ácido tetrahidrofólico (THF). La función coenzimática del THF consiste en la movilización y utilización de grupos funcionales de un solo carbono (metilo, metileno y formilo). Estas reacciones están implicadas en la síntesis de timidilato (asociada a la timidilato sintasa), purinas y varios aminoácidos (serina, glicina, metionina e histidina). Por lo tanto, el THF es absolutamente necesario para la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Fenech *et al.*, 1998).

Desde un punto de vista químico, el ácido fólico está formado por tres grupos distintos: (1) un anillo de pteridina heterocíclico bicíclico, la 6-metilpterina; (2) el ácido p-aminobenzoico (PABA), que es necesario también para el crecimiento de muchas bacterias; y (3) el ácido glutámico (Figura 1.24)

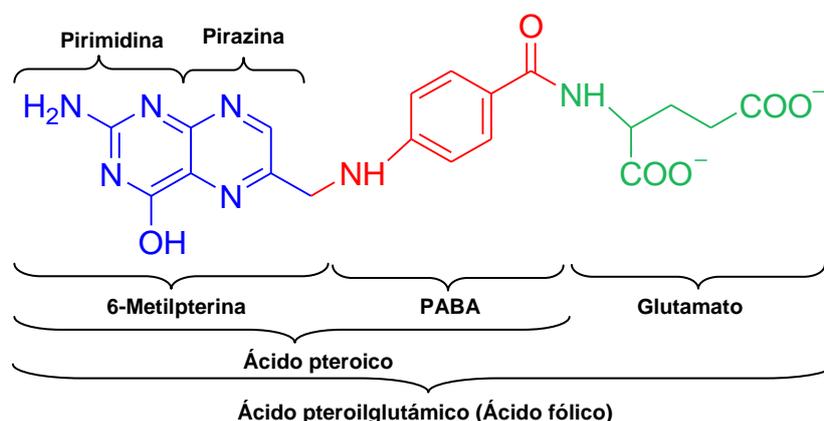


Figura 1.24. Estructura química del ácido fólico.

En la estructura del el ácido fólico, la 6-metilpterina está unida al PABA a través del grupo amino de éste, formando el ácido pterico que, a su vez, está unido al glutamato a través de un enlace amida, para formar pteroilmonoglutamato.

Los folatos que se encuentran en la naturaleza pueden diferir de ese compuesto en el número de residuos de glutamato por molécula de vitamina, que van de tres a ocho o incluso más. Estos residuos están ligados entre sí, no por un enlace peptídico habitual, sino por un enlace peptídico modificado en el que interviene el grupo α -amino de una molécula de glutamato y el grupo γ -carboxilo de la siguiente. La mayoría de las enzimas que utilizan coenzimas de folato se unen más estrechamente a las formas poliglutaminadas que a las monoglutaminadas.

La vitamina fue descubierta en los años treinta y se observó que era abundante en los vegetales de hoja verde, por lo que se denominó ácido fólico en relación a la raíz latina *folium*, que significa hoja. Los mamíferos, a diferencia de los organismos procariontes y las plantas, somos incapaces de sintetizar los coenzimas del ácido fólico, por lo tanto, para nosotros es un nutriente esencial que

debe de ser ingerido con la dieta. Esta vitamina es abundante en vísceras de animales, verduras de hoja verde, legumbres, levadura de cerveza, frutos secos y granos enteros, pero se pierde en los alimentos conservados a temperatura ambiente y durante la cocción.

La forma predominante en los alimentos es el 5-metil-tetrahidrofolato (5-metil-THF), pero esta forma se oxida fácilmente a 5-metil-dihidrofolato (5-metil-DHF) que representa una cantidad importante del folato total que ingerimos. Una vez ingerido, el 5-metil-DHF es reducido de nuevo a 5-metil-THF gracias al ácido ascórbico presente en el estómago. Esta forma reducida es resistente a los ácidos estomacales y es absorbida en el yeyuno. Una vez en el interior del enterocito, los folatos poliglutaminados son hidrolizados a folatos monoglutaminados por la enzima pteroil-y-glutamihidrolasa para dar 5-metil-THF monoglutaminado que sale a la sangre, desde donde se distribuye a los tejidos. Las células animales capturan los folatos en su forma monoglutaminada. Sin embargo, esta forma puede transportarse también al exterior de la célula, por lo que una vez en el interior celular se conjuga con otros residuos de glutamato adicionales, lo que facilita la retención intracelular. El ácido fólico, a diferencia de otras vitaminas hidrosolubles, se almacena en el hígado, aunque parte es excretado en la orina y las heces. Este almacenamiento hepático, reduce la necesidad de una ingesta diaria de ácido fólico.

La deficiencia de ácido fólico se manifiesta con diarreas, náuseas, pérdida de apetito, pérdida de peso, debilidad, fatiga, úlceras bucales, llagas linguales, aparición de canas, taquicardias, dolor de cabeza, irritabilidad y desórdenes de conducta. En adultos, la deficiencia avanzada de ácido fólico causa anemia megaloblástica. En niños, esta deficiencia causa un retardo del crecimiento. Durante el desarrollo embrionario, el déficit de ácido fólico causa defectos del tubo neural que resultan en malformaciones de la columna vertebral (espinas bífidas), así como del cráneo y el cerebro (anencefalia). Para evitar estas malformaciones en el feto, se recomienda que las mujeres tomen suplementos de esta vitamina, al menos, un mes antes de la concepción y durante el primer trimestre del embarazo (Shaw *et al.*, 1995). Otras situaciones en las que suele haber un déficit de esta vitamina y se aconseja un suplemento de ácido fólico son: ancianos, personas fumadoras o alcohólicas, personas afectadas por la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa o celiaquía, pacientes con VIH, hipotiroidismo, síndromes mieloproliferativos crónicos, mieloma o leucemias agudas, síndromes hemolíticos crónicos y pacientes sometidos a hemodiálisis crónica. Determinados fármacos interfieren en el metabolismo del folato disminuyendo su absorción (Baggott *et al.*, 1992; Morgan *et al.*, 1998). Entre ellos destacan los anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), los anticonvulsivantes (como la fenitoína y el fenobarbital), el litio (utilizado para el tratamiento del trastorno bipolar), los hipolipemiantes (como la colestiramina), el metotrexato (usado para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis y ciertos tipos de cáncer), los antihiper glucemiantes (como la buformina, la fenformina y la metformina), los anticonceptivos orales, los diuréticos (como el triamterene), los antibióticos (como el trimetoprim y la nitrofurantoína) y los antiparasitarios (como la pirimetamina y la pentamidina), entre otros.

1.3.2. DIHIDROFOLATO REDUCTASA

Una vez dentro de la célula, el folato se convierte en sus formas activas mediante dos reducciones sucesivas de la parte pirazina del anillo de pteridina. Ambas reacciones son catalizadas por la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) que utiliza como cofactor NADPH. La primera reducción da lugar a 7,8-dihidrofolato (DHF) y la segunda reducción genera 5,6,7,8-tetrahidrofolato (THF)

(Figura 1.25). Aunque la DHFR puede actuar sobre el folato o sobre el DHF, el sustrato preferido de la enzima es el DHF, de ahí su nombre.

Como se describió con anterioridad, la función coenzimática del THF es fundamental para el metabolismo nitrogenado de la célula, lo que hace que la inhibición de la DHFR sea crítica al provocar un bloqueo de la síntesis, la metilación y la reparación del ADN que conlleva a la muerte celular por apoptosis. Esto hace que esta enzima sea muy interesante como diana farmacológica, no sólo frente a células tumorales, sino también frente a hongos, protozoos, bacterias o células responsables de procesos autoinmunes (Blakley, 1969). De hecho, esta enzima es la diana de los fármacos conocidos como antifolatos.

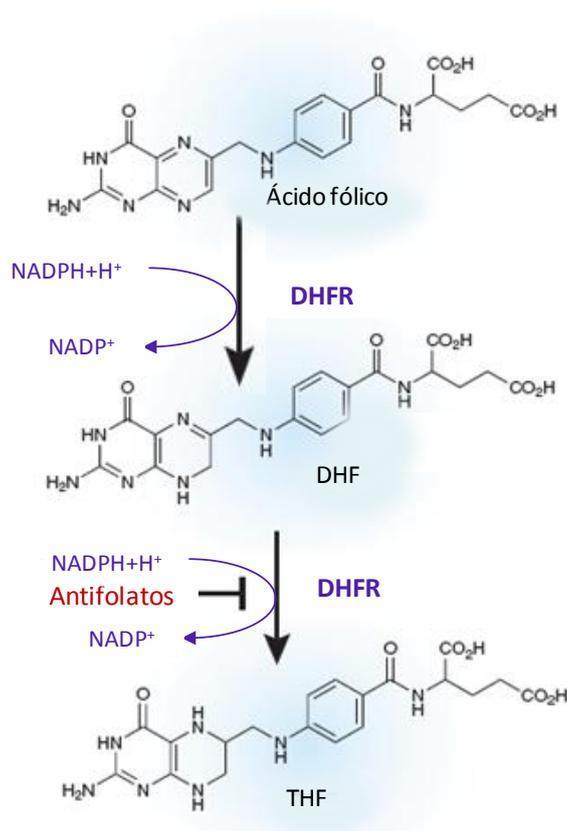


Figura 1.25. Reducción del ácido fólico a DHF y de éste a THF catalizadas por la enzima DHFR.

1.3.2.1. Mecanismo de acción

Tanto la cinética como el mecanismo de acción de la DHFR han sido estudiados en profundidad utilizando enzima proveniente de diversas fuentes biológicas. Uno de los estudios pioneros en esta caracterización fue llevado a cabo por el grupo del Profesor Benkovic (Fierke *et al.*, 1987), quien propuso un esquema catalítico completo para la actuación de la DHFR de *Escherichia coli* (ecDHFR) (Figura 1.26). Según este modelo, la unión del sustrato (DHF) al holoenzima (E:NADPH), conduciría a la formación del complejo ternario de Michaelis (E:DHF:NADPH) el cual, tras la transferencia del ión hidruro, formaría el complejo ternario de productos (E:THF:NADP⁺). La disociación del cofactor oxidado conduce a la formación del complejo binario del producto (E:THF) el cual vuelve a unir NADPH para formar el complejo de liberación del producto (E:THF:NADPH) donde la entrada de

NADPH favorece la liberación de THF. Así, la forma libre de la enzima no se genera durante la reacción y el complejo E:NADPH comienza un nuevo ciclo catalítico. A pesar de que el evento químico fundamental es la transferencia del hidruro desde el NADPH al DHF, este paso no es la etapa limitante de la reacción. La etapa limitante es un proceso físico, la entrada del NADPH que facilita la liberación de THF.

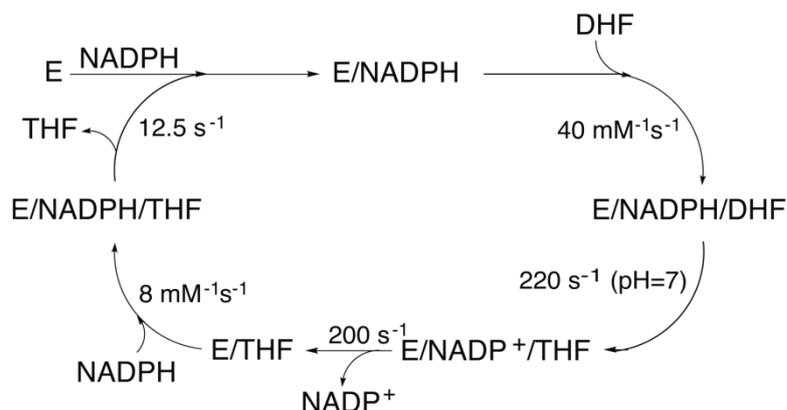


Figura 1.26. Esquema del ciclo catalítico de la enzima DHFR bacteriana.

En la actualidad existen discrepancias sobre la procedencia del protón transferido al N5 del grupo de la pterina en el DHF durante la reacción de la DHFR. Un residuo de ácido aspártico (Asp-27) en las enzimas bacterianas y uno de ácido glutámico (Glu-30) en las animales son los únicos grupos ionizables en el centro activo de la enzima y, por lo tanto, capaces de donar un protón al sustrato. Estudios de mutagénesis dirigida de este residuo en la DHFR bacteriana parecen apoyar esta función catalítica del Asp-27 (Howell *et al.*, 1986). La velocidad de transferencia del protón es dependiente del pH, con un pK_a de 6.5, el cual ha sido atribuido al Asp-27. Este alto valor de pK_a para este residuo de aspartato parece estar relacionado con el entorno que rodea a este residuo en el centro activo de la enzima. Sin embargo, otros autores discrepan sobre el hecho de que la procedencia del protón pueda ser el Asp-27 o el Glu-30, ya que estos residuos se sitúan a más de 5 Å del N5 del DHF, lo que imposibilitaría la transferencia directa de estos protones. Según estos autores la transferencia del protón sería directa a través del disolvente (Chen *et al.*, 1994). Este último mecanismo también ha sido apoyado por estudios basados en cálculos teóricos (Rod y Brooks, 2003).

Las DHFRs eucariotas presentan ciertas diferencias respecto a su ciclo catalítico. Por ejemplo, en la enzima humana (hDHFR) las velocidades de disociación del THF y del $NADP^+$ del complejo ternario son similares, lo que hace que sean posibles dos rutas de liberación de producto. Si se disocia primero el $NADP^+$, queda el complejo binario E:THF. Dado que la liberación del THF es mucho más rápida cuando se une el NADPH, una nueva molécula de NADPH forma el complejo ternario mixto. La velocidad de reacción en este caso se encuentra limitada parcialmente por la liberación del $NADP^+$ y del THF del complejo ternario mixto y aumenta al aumentar la concentración de NADPH. Pero si se disocia primero el THF del complejo ternario de productos, se genera el complejo binario E: $NADP^+$, el cual puede unir DHF formando el complejo ternario mixto E: $NADP^+$:DHF, para el cual la liberación del $NADP^+$ es lenta y limitante de velocidad, por lo que a este complejo ternario se le considera un complejo sin salida. Sin embargo, a bajas concentraciones de DHF, puede disociarse el $NADP^+$ del complejo E: $NADP^+$, y el flujo a través de esta ruta es potencialmente más rápido que a través del complejo E: $NADP^+$:DHF. Cuando la concentración de DHF es muy baja, su unión para la formación del

complejo E:NADPH:DHF es la etapa limitante por lo que el flujo a través de esta ruta viene dictado principalmente por la concentración de DHF. Pero aún en condiciones óptimas la k_{cat} de esta ruta es nueve veces inferior a la de la ruta en la que se disocia primero el $NADP^+$.

1.3.2.2. Estructura de la DHFR

La gran importancia biológica de la DHFR en la producción de nuevos fármacos ha hecho que se desarrollen múltiples estudios estructurales sobre esta enzima. La DHFR ha sido aislada y purificada de múltiples organismos, desde humanos hasta bacterias. Su estructura cristalina, en la mayoría de los casos, ha sido resuelta por difracción de rayos X, existiendo más de 40 estructuras en la base de datos del Protein Data Bank (Schnell *et al.*, 2004).

Los primeros estudios de cristalización se realizaron con la ecDHFR, que es una proteína pequeña (18 kDa) con una estructura constituida por 8 láminas β (denominadas A-H) y 4 hélices α (denominadas αB , αC , αE , y αF) conectadas entre sí por bucles o *loops* (Figura 1.27). La hendidura del centro activo divide a esta estructura en dos dominios estructurales: el dominio de unión a la adenosina y el dominio principal.

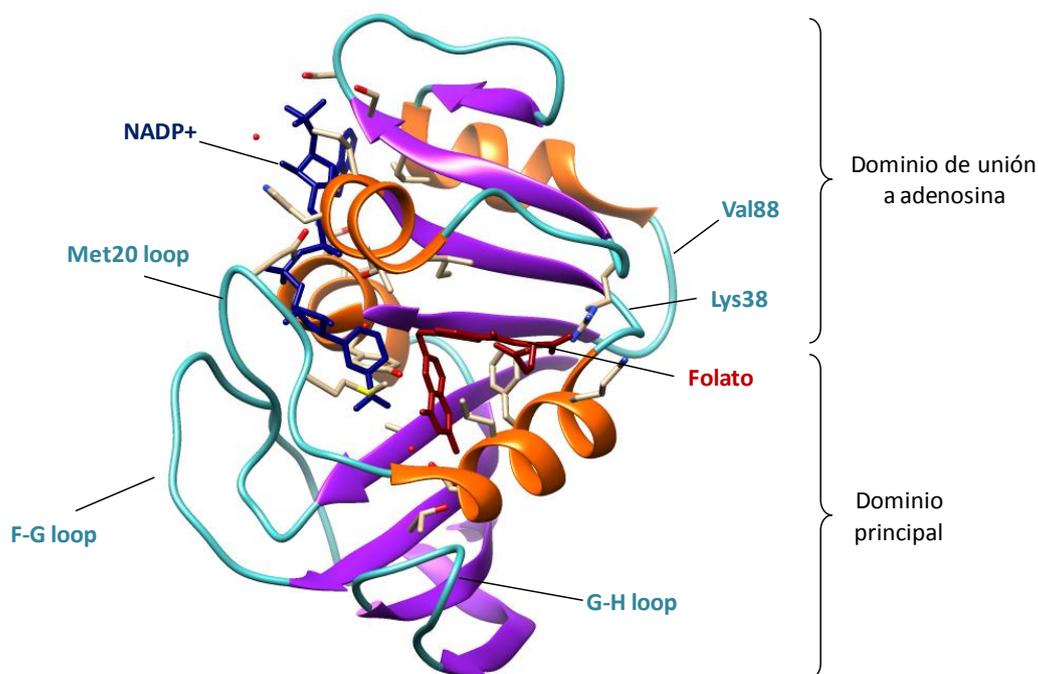


Figura 1.27. Estructura tridimensional de la enzima DHFR unida a $NADP^+$ y al ácido fólico mostrando sus distintos dominios, así como los distintos loops y los aminoácidos más relevantes para su estructura y función.

El dominio de unión a la adenosina (correspondiente a los residuos 38-88 en ecDHFR) es el más pequeño de los dos y constituye el sitio de unión para la cadena de adenosina del $NADPH$. El dominio principal está formado por los residuos 1-37 y 89-159 y contiene un total de tres bucles donde se sitúa la región de unión a los ligandos alrededor del centro activo. Estos bucles constituyen el 40-50% de la longitud total del dominio principal, por lo que también es conocido como el “dominio bucle”. Estos bucles se denominan bucle Met20 (residuos 9-24), F-G (residuos 116-132) y G-H (residuos 142-150). Los bucles Met20 y F-G también son denominados bucles 1 y 2, respectivamente, por otros autores. El libre giro alrededor de los residuos Lys-38 y Val-88 permite al dominio de unión a la

adenosina moverse relativamente sobre el dominio principal una vez que se han unido los ligandos, lo que permite cerrar la entrada al centro activo (Byströff y Kraut, 1991; Schnell *et al.*, 2004). Las DHFRs animales poseen entre 20 y 30 residuos más que las bacterianas, los cuales se reparten en nueve inserciones a lo largo de la secuencia primaria de la proteína y se sitúan, en su mayoría, en bucles alejados del centro activo.

1.3.2.3. El centro activo de la DHFR y su movimiento durante el ciclo catalítico

El centro activo del enzima está localizado en una hendidura hidrofóbica situada en la zona de unión entre los dos dominios, con los residuos Lys38 y Val88 actuando como bisagra entre ambos. En el complejo ternario con NADPH y ácido fólico, el anillo de pterina del sustrato y el anillo de nicotinamida del cofactor están muy próximos, con el átomo donador (C4 del NADPH) y aceptor del protón (C6 del anillo de pterina) a distancias óptimas para interacciones de Van der Waals (Byströff y Kraut, 1991). El bucle Met20 protege al centro activo de su interacción con el disolvente y es el principal componente estructural que determina la estructura del centro activo. Los bucles F-G y G-H juegan un papel estabilizador de la estructura gracias a su interacción mediante puentes de hidrógeno con el bucle Met20.

En base a estudios de rayos X realizados con ecDHFR, libre y unida a varios ligandos, Sawaya y Kraut propusieron un modelo estructural para los cambios conformacionales que ocurren durante el ciclo catalítico. El factor determinante para que la enzima se encuentre en una u otra conformación es la unión de los sustratos y/o el cofactor al centro activo de ésta (Sawaya y Kraut, 1997). Este modelo sugiere que el loop Met20 adopta una conformación cerrada cuando el anillo de nicotinamida del NADPH está localizado en el centro activo, es decir en el holoenzima (E:NADPH) y en el complejo de Michaelis (E:NADPH:DHf). Tras la transferencia del ión hidruro, el anillo de nicotinamida sería excluido del bolsillo de unión debido a un choque estérico con el anillo de pterina del THF, de manera que el resto de los complejos del ciclo catalítico (E:NADP⁺:THF, E:THF y E:NADPH:THF) adoptarían una conformación ocluida (Figura 1.28). Además de estas dos conformaciones, se ha descrito que la enzima puede adoptar las conformaciones abierta y desordenada, pero éstas serían estados intermedios entre las conformaciones cerrada y ocluida que no se generarían durante el ciclo catalítico de la enzima.

Las conformaciones cerrada y ocluida difieren en la estructura que adopta el bucle Met20 y en las interacciones por puentes de hidrógeno entre el bucle Met20 y los bucles F-G y G-H (Figura 1.28). En el estado ocluido, la zona central del bucle Met20 forma una hélice con los residuos Met-16 y Glu-17 ocupando el centro activo de la enzima, donde obstruyen la unión del anillo de la nicotinamida del cofactor (Sawaya y Kraut, 1997). Además, la conformación ocluida se estabiliza por puentes de hidrógeno entre Asn-23 en el bucle Met20 y Ser-148 en el bucle G-H. Por el contrario, en la conformación cerrada, los residuos Met-16 y Glu-17 se encuentran fuera del centro activo, permitiéndose, así, la unión del cofactor a la enzima. Además, las cadenas de Asn-18 y Met-20 permiten la estabilización del complejo ternario y las interacciones entre Asn-23/Ser-148 se rompen, generándose nuevas interacciones entre el Asp-122 del bucle F-G y dos residuos (Gly-15 y Glu-17) del bucle Met20. De esta manera, este cambio entre las distintas conformaciones modularía la actividad de la enzima, así como su unión a sustratos, cofactores y productos.

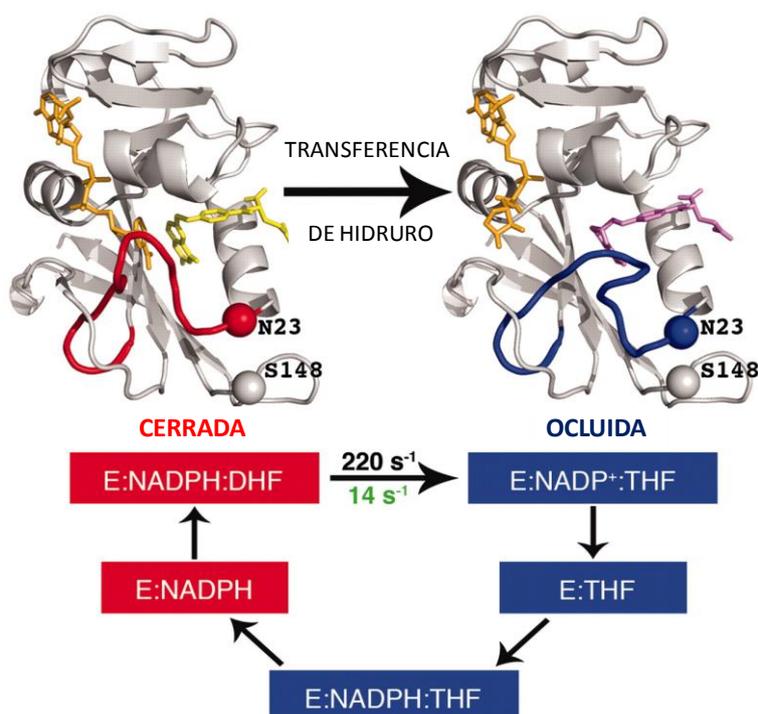


Figura 1.28. Esquema de los cambios conformacionales de la estructura tridimensional de la enzima DHFR durante el ciclo catalítico.

1.3.2.4. El gen de la DHFR

El gen de la DHFR (*DHFR*) está localizado en el cromosoma 5q11.2-q13.2, tiene una longitud total de 30 kb y contiene 6 exones separados por 5 intrones (Chen *et al.*, 1984). Debido a la importancia de este gen para el funcionamiento general del organismo, son pocas las variaciones y mutaciones encontradas en él ya que, probablemente, cualquier mutación llevaría a la inviabilidad del organismo. Este gen ha sido objeto de estudio debido a que se encuentra frecuentemente amplificado en células que presentan una alta resistencia a los antifolatos (Göker *et al.*, 1995; Lesuffleur *et al.*, 1991; Singer *et al.*, 2000). Goker y colaboradores (1995) demostraron que la amplificación de la DHFR es responsable de la resistencia a MTX en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) y que esta amplificación estaba asociada a mutaciones en el gen *TP53*. Además, Srimatkandada y colaboradores describieron, en células de cáncer de colon resistentes a MTX, la amplificación de una variante del gen de la DHFR que presentaba una sustitución de fenilalanina por serina en la posición 91 que originaba una enzima con una afinidad por el MTX unas 25 veces inferior a la enzima nativa (Srimatkandada *et al.*, 1989).

1.3.3. METABOLISMO DEL ÁCIDO FÓLICO

Como se mencionó anteriormente, el THF actúa como transportador de unidades de un solo átomo de carbono. Este fragmento monocarbonado está unido al átomo N5, al N10, o puede formar un puente entre ambos y puede existir en tres estados de oxidación. La forma más reducida corresponde al grupo metilo (-CH₃) y la forma intermedia corresponde al grupo metileno (-CH₂-). Las formas más oxidadas corresponden al grupo formilo (-CH=O), al aducto cíclico metenilo (=CH-) y al grupo formimino (-CH=NH₂) (Figura 1.29).

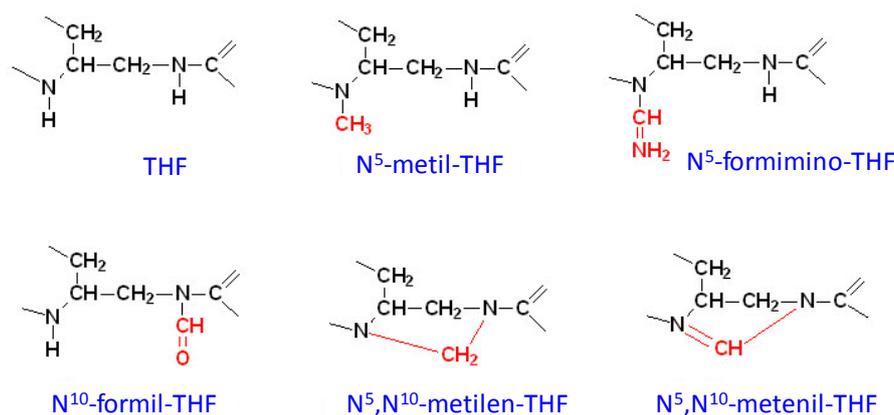


Figura 1.29. Estructura química de los distintos coenzimas del ácido fólico portadores de unidades de un carbono en forma metilo, formimino, formilo, metileno y metenilo.

La principal fuente de las unidades de un carbono en el metabolismo del folato es el carbono β de la serina en una reacción catalizada por la enzima serina hidroximetil transferasa (SHMT). En esta reacción, se genera glicina y el THF es convertido a N⁵,N¹⁰-metilen-THF (reacción 2; Figura 1.30). Esta reacción es reversible y puede ser utilizada en el sentido opuesto para la biosíntesis de serina si es necesario. Otras fuentes alternativas de unidades de un carbono son: el ácido formimino glutámico (procedente del catabolismo de la histidina) a partir del cual se genera N⁵-formimino-THF y glutamato (reacción 3; Figura 1.30); la vía de degradación de la glicina mitocondrial que genera N⁵,N¹⁰-metilen-THF, CO₂ y NH₄ a partir del aminoácido glicina (reacción 4; Figura 1.30); y el catabolismo de la colina, cuya unidad de un átomo de carbono se utiliza para generar metionina a partir de homocisteína. En una menor proporción, en los tejidos de mamíferos se genera N¹⁰-formil-THF a partir de ácido fórmico, ATP y THF (reacción 6; Figura 1.30).

Una vez que una unidad de carbono ha sido activada mediante su unión al THF, puede sufrir una serie de interconversiones, como el cambio en su estado de oxidación, o puede utilizarse directamente en reacciones biosintéticas.

En el ciclo de remetilación de la homocisteína, el N⁵,N¹⁰-metilen-THF es convertido por la N⁵,N¹⁰-metilen-THF reductasa (N⁵,N¹⁰-MTHFR) en N⁵-metil-THF (reacción 7; Figura 1.30). Esta es la única reacción capaz de producir N⁵-metil-THF e, *in vivo*, es irreversible. Este N⁵-metil-THF es utilizado para la conversión de homocisteína en metionina por acción de la metionina sintasa, dando THF (reacción 5; Figura 1.30). Esta metionina puede ser activada por el ATP en una reacción catalizada por la enzima metionina adenosil transferasa para generar S-adenosil metionina (SAM) (reacción 8; Figura 1.30), que actúa como donador de grupos metilo para las reacciones de metilación de una amplia variedad de biomoléculas, entre ellas el ADN.

El papel más importante de los derivados del ácido fólico es la transferencia de carbono durante la síntesis de nucleótidos. Durante la ruta de síntesis *de novo* de las purinas, dos de los intermediarios, glicinamida ribonucleótido (GAR) y aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleótido (AICAR), reciben, cada uno, una unidad de un carbono del N¹⁰-formil-THF, que se convierten en los átomos de carbono 8 y 2 del anillo de purina, respectivamente. Las enzimas responsables son la GAR transformilasa (reacción 9; Figura 1.30) y la AICAR transformilasa (reacción 10; Figura 1.30).

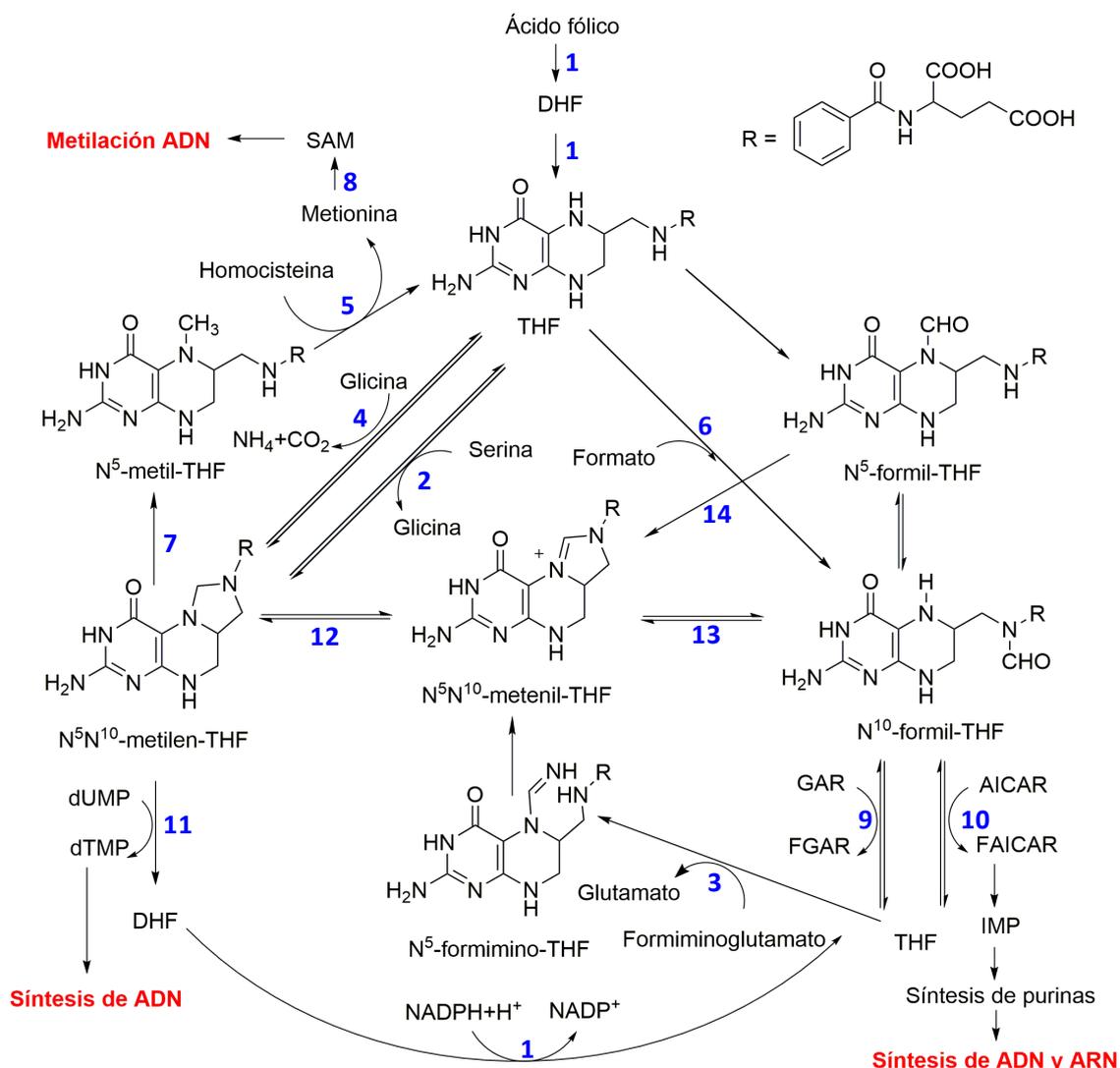


Figura 1.30. Esquema del metabolismo del ácido fólico.

En la síntesis de nucleótidos de pirimidina, el N⁵,N¹⁰-metilen-THF es utilizado para metilar y reducir el dUMP para formar dTMP por la enzima timidilato sintasa (TS), produciendo DHF (reacción 11; Figura 1.30). Esta reacción constituye la etapa que limita la velocidad de síntesis del ADN. La expresión de la TS alcanza su pico máximo durante la fase S del ciclo celular en la cual, esta enzima forma parte de un complejo multienzimático denominado replicasa junto con la DHFR, la DNA polimerasa y otras enzimas necesarias para la síntesis de nucleótidos. Aunque la DHFR puede actuar tanto sobre folato como sobre DHF, durante la replicación esta enzima debe actuar de forma continua para regenerar el THF a partir del DHF que se forma en la reacción catalizada por la TS (reacción 1; Figura 1.30). Esto explica el hecho de que sea el DHF y no el folato el sustrato preferido de la enzima. Los antifolatos como el MTX (análogo del DHF) inhiben a la DHFR, responsable de la conversión de DHF en THF. Dado que la formación de dTMP es sensible a la disminución de los niveles de THF, estos fármacos causan una inhibición de la síntesis de ADN en aquellas células que se están dividiendo rápidamente como las células tumorales. Además, el DHF actúa como inhibidor

alostérico de la N^5,N^{10} -MTHFR, asegurando la prioridad de la síntesis de ácidos nucleicos sobre la formación de metionina.

El N^5,N^{10} -metilen-THF puede ser convertido por la metilen-THF deshidrogenasa en N^5,N^{10} -metenil-THF (reacción 12; Figura 1.30) que, a su vez, puede ser transformado por acción de la N^5,N^{10} -metenil-THF ciclohidrolasa en N^{10} -formil-THF (reacción 13; Figura 1.30) que puede ser utilizado para la síntesis de purinas. Por tanto, el N^5,N^{10} -metilen-THF ocupa un punto de ramificación clave entre tres rutas importantes en la célula, por lo que su producción mediante la SHMT y las demás fuentes representa un punto clave en el metabolismo de un carbono.

El N^5 -formil-THF o leucovorin se utiliza como terapia de rescate tras el tratamiento con MTX para el cáncer. Este N^5 -formil-THF está presente en las células pero no sirve como dador de carbono en las reacciones biosintéticas, por lo que, para su utilización, éste es convertido en N^5,N^{10} -metenil-THF por acción de la metenil-THF sintetasa.

1.3.4. ANTIFOLATOS

Los antifolatos fueron los primeros antimetabolitos en incorporarse a la clínica a finales de la década de 1940. Estos compuestos actúan como inhibidores competitivos de la enzima dihidrofolato reductasa que, como se ha descrito en el apartado 1.3.2. de esta memoria, 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. Los primeros antifolatos en demostrar su actividad antineoplásica fueron la aminopterina (AMT) y el metotrexato (MTX). Éstos fueron sintetizados en el laboratorio del Dr. Yellapragada Subbarow y utilizados, por primera vez, por el Dr. Sidney Farber para el tratamiento de niños con leucemia linfoblástica aguda avanzada. El compuesto más potente resultó ser la AMT, que logró producir, por primera vez en la historia, la remisión de la enfermedad en 10 de los 16 niños en los que se probó. Estos resultados fueron publicados en 1948 en la prestigiosa revista *New England Journal of Medicine*, constituyendo una de las primeras quimioterapias anticancerígenas de la historia de la medicina (Farber *et al.*, 1948). En la década de los 50, el MTX comenzó a reemplazar a la aminopterina debido a su menor toxicidad y, en las décadas sucesivas, su efectividad demostrada frente a diversos tipos de cáncer popularizó el uso de MTX e hizo que este se incorporara a los distintos regímenes anticancerígenos (Bertino, 2000).

En los años siguientes al descubrimiento de la efectividad de estos fármacos comenzó una búsqueda activa de la enzima diana de los mismos. A medida que se fue elucidando el metabolismo del ácido fólico, se fue testando el efecto de la AMT y el MTX sobre la actividad de las diversas enzimas implicadas en las transferencias de un carbono, pero ninguna de ellas resultó ser la diana de estos compuestos. En 1958, Osborn y Huennekens descubrieron que la enzima responsable de la reducción del ácido fólico a TFH era la DHFR (Osborn y Huennekens, 1958) y, en el mismo año, estos mismos autores comprobaron que esta enzima era la diana farmacológica de la AMT y el MTX (Osborn *et al.*, 1958). No fue hasta dos décadas más tarde, cuando se logró cristalizar los complejos enzima-inhibidor y elucidar completamente el mecanismo de acción de estos antifolatos (Schweitzer *et al.*, 1990; Sawaya y Kraut, 1997).

Los inhibidores de la DHFR se clasifican en antifolatos clásicos y no clásicos. Los primeros se caracterizan por poseer una cadena lateral del PABA. Esta característica les hace sustratos de los mismos sistemas responsables del transporte de los folatos fisiológicos. Los antifolatos no clásicos sustituyen la cadena lateral del PABA por una cadena lateral hidrofóbica, lo que hace que entren en la célula por difusión simple y no sean sustratos de los sistemas de transporte de folatos. Como antifolatos clásicos destacan la AMT y el MTX; y como antifolatos no clásicos destacan el trimetoprim (TMP) y la pirimetamina (PYR) (Figura 1.31).

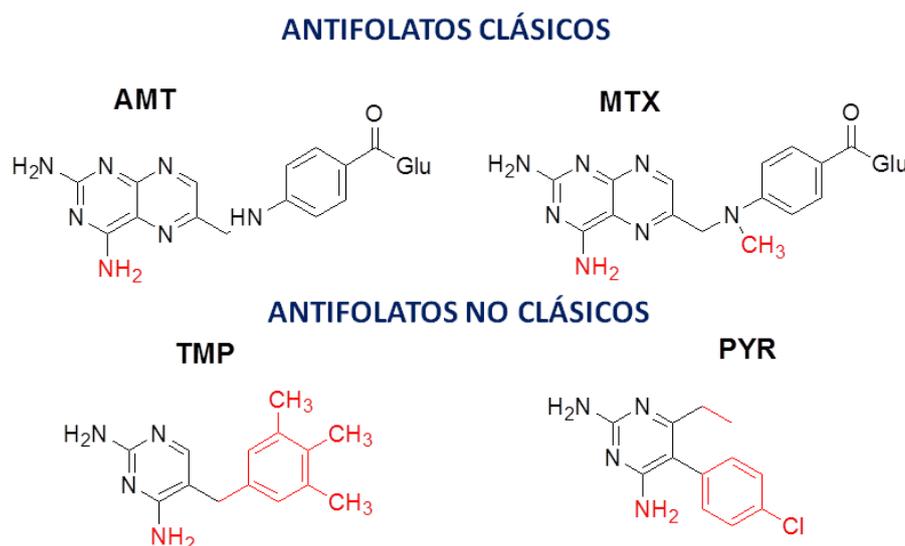


Figura 1.31. Estructura de los antifolatos clásicos aminopterin (AMT) y metotrexato (MTX) y no clásicos trimetoprim (TMP) y pirimetamina (PYR).

La toxicidad selectiva de los antifolatos sobre células que se están dividiendo activamente viene determinada por el consumo de THF para la síntesis de timidilato por la TS. En todas las reacciones de transferencia de un carbono que suceden en la célula se regenera el THF excepto en la reacción catalizada por la TS en la cual, además de producirse la transferencia de un carbono procedente del N^5, N^{10} -metilen-THF, se produce la oxidación del THF a DHF. Por ello, la actividad DHFR es esencial para la regeneración del THF que permite el funcionamiento de la TS y la síntesis de ADN. En células que están en fase S del ciclo celular, la inhibición de la DHFR conduce a un rápido descenso en los niveles de THF debido al elevado consumo por la TS, lo cual conduce a la inhibición de esta enzima, seguida de la inhibición de la síntesis de nucleótidos de purina y del ciclo de la metionina, lo cual provoca la muerte de la célula. Sin embargo, en células que no se están dividiendo y, por tanto, no están sintetizando activamente timidilato y ADN, la inhibición de la DHFR no produce un descenso tan elevado de los niveles de THF, por lo que no se bloquean estas vías (Schweitzer *et al.*, 1990).

Aunque la mayoría de los antifolatos tienen como diana farmacológica a la DHFR, también se han sintetizado otros antifolatos que inhiben otras enzimas del ciclo del ácido fólico, como la TS o la AICARTF. Entre los inhibidores de la TS el más utilizado es el 5-fluorouracilo (5-FU).

1.3.4.1. Aplicaciones clínicas de los antifolatos

Además de utilizarse para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, en la actualidad los antifolatos también se utilizan para el **tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes**.

Actualmente, se recomienda la administración de bajas dosis de MTX para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, la psoriasis, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y ciertas clases de lupus. Estos efectos se deben a que el MTX, a través del bloqueo del ciclo del ácido fólico, posee propiedades antiinflamatorias, controlando la expresión de ciertos genes, dependientes del factor de expresión NF- κ B, y que incluyen por ejemplo a la ciclooxygenasa-2, el TNF α y ciertas citoquinas (Cutolo *et al.*, 2001; Majumdar y Aggarwal, 2001).

Otros antifolatos tienen efectos **antibacterianos y antiparasitarios** gracias a que inhiben selectivamente a la enzima DHFR de bacterias y protozoos. Así, el TMP combinado con sulfonamidas constituye una terapia habitual para un gran número de infecciones bacterianas (de Roux y Lode, 2003), mientras que la PYR presenta una especificidad similar frente a la enzima de origen protozario y se ha utilizado, por ejemplo, para el tratamiento de la malaria (Bell *et al.*, 2008).

En cuanto a su uso en **quimioterapia anticancerígena**, en la actualidad el MTX es el antifolato más ampliamente usado para esta aplicación y se emplea para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello, mama, pulmón y próstata, entre otros (McGuire, 2003). Sin embargo, existen cánceres como el melanoma son especialmente resistentes a este agente (Kufe *et al.*, 1980). Dado que esta Tesis Doctoral, se ha centrado en el estudio de la resistencia del melanoma a los antifolatos utilizando como modelo el MTX, a continuación se describen en detalle las características de este fármaco.

1.3.4.2. Metotrexato

El MTX difiere del ácido fólico en la sustitución del grupo oxo en la posición 4 del anillo de pteridina por un grupo amino, al igual que la AMT, y en la introducción de un grupo metilo adicional en la posición 10 (Figura 1.32). Estas mínimas alteraciones estructurales hacen que la DHFR presente mayor afinidad por el MTX que por sus sustratos e impiden que pueda ser reducido por ella, convirtiéndolo en un inhibidor competitivo respecto al folato o al DHF.

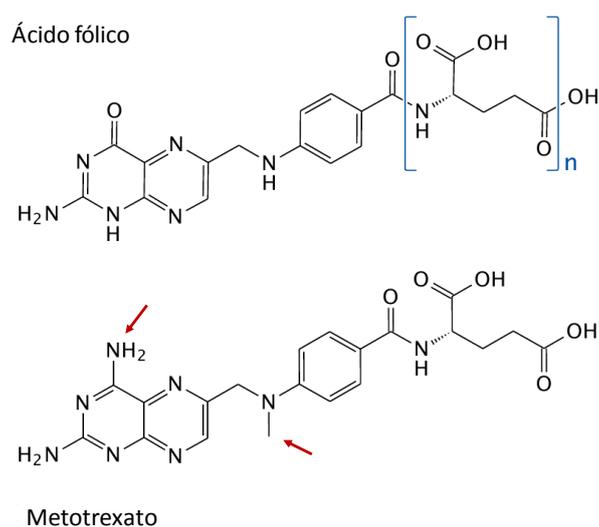


Figura 1.32. Estructura del ácido fólico y del metotrexato señalando las diferencias entre ambas moléculas (flechas rojas).

Este incremento en la afinidad se atribuye a un aumento de las interacciones del inhibidor con la enzima. La sustitución del grupo 4-oxo del folato por un grupo amino en el MTX aumenta la basicidad

del N1, el cual se encuentra protonado en el MTX, a diferencia del folato en el que se encuentra protonado el N3 (Cocco *et al.*, 1983). Este cambio de basicidad lleva a que la interacción iónica con el residuo ácido conservado en el centro activo (Asp-27 en las enzimas bacterianas y Glu-30 en las animales) sea más favorable con el N1 que con el N3 en el complejo de la enzima con el inhibidor, para lo que la molécula de MTX tiene que girar 180° respecto al enlace C6-C9 (Figura 1.33) fortaleciendo así dicha interacción, ya que establece dos puentes de hidrógeno adicionales. Este giro de 180° se da, en general, en los antifolatos 2,4-diamino respecto a los sustratos e inhibidores 2-amino-4-oxo como el DHF y el folato (Cody *et al.*, 2004).

El MTX es un excelente inhibidor de la DHFR ($K_i = 5 \mu\text{M}$). Sin embargo, a pesar de esta gran potencia inhibitoria, muchos estudios indican que la concentración intracelular de MTX necesaria para inhibir la síntesis de THF *in vivo* debe ser al menos de $1 \mu\text{M}$ (Appleman *et al.*, 1988; Domin *et al.*, 1982; Rosowsky *et al.*, 2000). La base molecular de esta discrepancia entre la inhibición de DHFR en sistemas *in vivo* e *in vitro* es conocida actualmente (Jackson y Harrap, 1973; Jackson *et al.*, 1977; White, 1979; White y Goldman, 1981). La actividad de la DHFR en las células es muy alta comparada con la actividad relativa de la TS, por lo que los niveles intracelulares de DHF son muy bajos ($\approx 10 \text{ nM}$) (Moran *et al.*, 1976). Debido a que la K_m de la DHFR por el DHF está en el rango de $1 \mu\text{M}$, la enzima trabaja en cinética de primer orden sobre su sustrato, es decir, muy lejos de las concentraciones de saturación. En estas condiciones, sólo una pequeña fracción de la actividad DHFR es necesaria para satisfacer las necesidades celulares en cuanto a la síntesis de THF. Sin embargo, una vez que las células han sido expuestas al MTX, y este se une fuertemente a la enzima, la concentración de DHF aumenta y se acumula en la célula, uniéndose a la fracción libre de la DHFR. Inicialmente, la unión de DHF a la DHFR mantiene una velocidad constante en la formación de THF; sin embargo, una vez que la concentración de DHF aumenta unas 1000 veces (desde 10 nM hasta $10 \mu\text{M}$), éste empieza a competir con el MTX por la unión a la DHFR. Por este motivo, la concentración de MTX en las células debe ser mucho mayor para inhibir la DHFR en el interior de la célula. Otro factor que afecta la citotoxicidad del MTX es su tasa de poliglutaminación como veremos en el apartado 1.3.6.

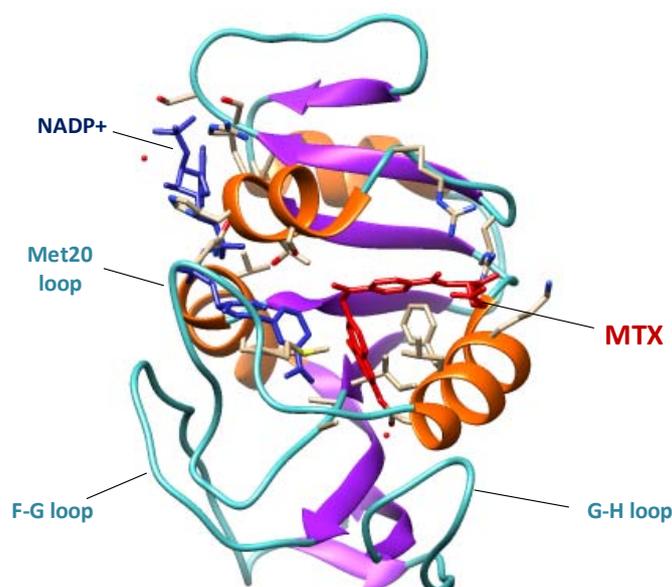


Figura 1.33. Estructura tridimensional de la enzima DHFR unida a NADP+ y a metotrexato.

En la actualidad, el MTX es el antifolato más ampliamente usado en oncología clínica para el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda, linfomas no-Hodgkin's, cáncer de mama, cáncer de cabeza y cuello, coriocarcinoma, sarcomas osteogénicos y otras leucemias. Además, también se ha empleado para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y autoinmunes como el asma, la artritis reumatoide, la colitis ulcerosa, el lupus eritematoso, el rechazo de transplantes y la psoriasis, por sus propiedades antiinflamatorias e inmunosupresoras (Cutolo *et al.*, 2001; Prichard *et al.*, 1993; Tian y Cronstein, 2007; van Ede *et al.*, 1998).

Por otra parte, el leucovorín se usa como antídoto en terapias de rescate después de la administración de altas dosis de MTX. Éste compite con el MTX y sus metabolitos por el transporte, la poliglutaminación y la unión a la DHFR. Además, permite recuperar los niveles de folatos reducidos evitando la inhibición de la DHFR. Estos procesos ocurren más eficientemente en el tejido normal que en el tumoral y, así, se rescatan preferentemente las células normales (McGuire, 2003). A pesar de su utilidad, el MTX presenta ciertas desventajas. Entre ellas se encuentra el estrecho espectro de tumores a los que se aplica, especialmente en lo que a tumores sólidos se refiere, la incapacidad de traspasar la barrera hematoencefálica y la resistencia intrínseca y adquirida hacia el MTX de algunos tumores que limita su eficacia clínica. Otra desventaja del uso del MTX es su alta toxicidad general, que produce daños a nivel de la médula ósea, ulceración gastrointestinal y daño hepático y renal (Takimoto, 1996).

1.3.5. MECANISMOS DE TRANSPORTE DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS

Los coenzimas del ácido fólico y los antifolatos clásicos contienen en su estructura, al menos una molécula de ácido glutámico por lo que, a pH fisiológico se comportan como aniones divalentes. Esta característica hace que no puedan atravesar libremente las membranas biológicas, de manera que, para ser incorporados por las células necesitan de sistemas de transporte (Matherly *et al.*, 2014). En las células de mamíferos se han descrito tres sistemas de transporte para estos compuestos: el transportador de folatos reducidos, los receptores de ácido fólico y los transportadores de folato de bajo pH.

1.3.5.1. Transportador de Folatos Reducidos

El transportador de folatos reducidos (RFC, del inglés *reduced folate carrier*, también denominado SLC19A1) es el principal sistema de transporte de folatos reducidos y de antifolatos como el MTX en los tejidos sistémicos en condiciones fisiológicas de pH (Matherly y Goldman, 2003). Sin embargo, su actividad desciende de forma drástica cuando el pH se encuentra por debajo de 7. El gen *SLC19A1* humano se localiza en el cromosoma 21q22.3 y consta de cinco exones que codifican una proteína de 591 aminoácidos que presenta un sitio de glicosilación (Asn58) (Hou *et al.*, 2014). Pertenece a la familia de transportadores SLC19 (acrónimo del inglés *solute carrier family 19*), junto con los transportadores de tiamina SLC19A2 y SLC19A3, con los que comparte la estructura de doce segmentos transmembrana con el N y el C terminal, así como el loop entre los dominios 6 y 7, dirigidos hacia el citosol. El RFC humano forma homo-oligómeros en los que cada monómero funciona como una unidad de transporte independiente completamente activa (Hou *et al.*, 2010). El N5-formil-THF, el N5-metil-THF y antifolatos como el MTX son excelentes sustratos para el RFC, con una Km de 1-10 μM , mientras que este receptor tiene una afinidad muy baja por el ácido fólico (Km=200-400 μM) (Zhao *et al.*, 2009). La actividad de este transportador no está ligada a la hidrólisis

de ATP, sino que se piensa que este transportador media la entrada de folatos reducidos y antifolatos mediante un sistema de antiporte con aniones. Se ha visto que la capacidad de transporte del receptor es muy sensible a las variaciones en el gradiente transmembranal de fosfatos orgánicos. La concentración de estos fosfatos es menor en el medio extracelular que en el interior celular, donde se sintetizan en reacciones dependientes de ATP y son fuertemente retenidos. Por ello, algunos autores postulan que este gradiente proporciona la fuerza motora para el antiporte de folatos con fosfatos orgánicos (Matherly *et al.*, 2014). Sin embargo, otros autores postulan que el transporte a través de este transportador se estimula por el gradiente de pH (pH extracelular < pH intracelular) por lo que la entrada de folatos o antifolatos podría producirse mediante un simporte con H⁺ o a un antiporte con OH⁻ (Ganapathy *et al.*, 2004).

El RFC se expresa en todas las células del organismo. Sin embargo, los tejidos con mayor nivel de expresión de RFC son la placenta y en el hígado, aunque también se expresa notablemente en tejidos como el riñón, el pulmón, la médula ósea, el intestino, el cerebro y el sistema nervioso central. Bajos niveles de RFC resultan en un gran número de situaciones fisiopatológicas asociadas con la deficiencia de folato como enfermedades cardiovasculares, anormalidades fetales, desórdenes neurológicos y, posiblemente, cáncer (Hou y Matherly, 2014). El RFC es importante para el desarrollo dado que la inactivación de los dos alelos del gen RFC en ratón resulta letal (Zhao *et al.*, 2001).

1.3.5.2. Receptores de Folato de alta afinidad

Los receptores de folato de alta afinidad (FR, por sus siglas en inglés *Folate Receptor*) son tres proteínas (FR- α , FR- β y FR- γ) que presentan un 68-79% de homología en su secuencia de aminoácidos y están codificadas por tres genes distintos localizados en el cromosoma 11. Las proteínas FR- α y FR- β están ancladas a la membrana a través de un residuo glicosil fosfatidil inositol (GPI), mientras que el FR- γ no está unido a GPI y es secretado. Estos FR tienen una mayor afinidad por las formas oxidadas de folato que por las formas reducidas (Spinella *et al.*, 1995). El FR- β se expresa en tejidos hematopoyéticos (bazo, timo y monocitos CD34+) y, en particular, en neoplasias hematopoyéticas como la leucemia mieloide crónica (Ross *et al.*, 1999). También se expresa en macrófagos activados y macrófagos infiltrantes del tumor (Puig-Kröger *et al.*, 2009). El FR- γ se expresa en altos niveles en células T reguladoras, así como cuando estas células se inducen con TGF β (Yamaguchi *et al.*, 2007). El FR- α se expresa en la membrana de algunos tejidos epiteliales, en particular en la placenta, la membrana apical de las células del túbulo renal proximal, el epitelio pigmentario de la retina y los plexos coroideos (Kamen y Smith, 2004). Además, el FR- α se encuentra sobreexpresado en diversos cánceres epiteliales respecto a los correspondientes tejidos sanos y su expresión parece aumentar con la progresión tumoral (Parker *et al.*, 2005). Este hecho ha despertado el interés por el estudio de este receptor y ha llevado al desarrollo de estrategias terapéuticas encaminadas a introducir agentes citotóxicos de forma selectiva en las células tumorales mediante la conjugación de estos agentes con los folatos transportados por el receptor (Laemon y Low, 1991).

En la década de los 90, algunos autores propusieron un mecanismo de transporte de folatos por el FR- α mediante pinocitosis. Según este modelo, las moléculas de FR- α se encontrarían concentradas en invaginaciones de la membrana denominadas caveolas y, tras la unión de los folatos, se produciría el cierre transitorio de estas invaginaciones seguido de la acidificación de las mismas, lo cual llevaría a la disociación entre el FR- α y el folato que sería transportado al interior celular (Rothberg *et al.*, 1990). En la actualidad se sabe que las moléculas de FR- α no están

localizadas permanentemente en caveolas, sino que están distribuidas de forma difusa en la superficie celular. Por ello, el mecanismo de transporte más aceptado para este receptor es la endocitosis mediada por receptor (Sabharanjak y Mayor, 2004). Según este modelo, los folatos se unirían al FR- α en la membrana celular, la cual se invaginaría y formaría vesículas que pasarían al citoplasma. Estas vesículas circularían en los compartimentos endosomales, donde se irían acidificando progresivamente. Finalmente, el bajo pH facilitaría la disociación entre el FR- α y los folatos. Estos folatos serían liberados de la vesícula al citosol mediante algún mecanismo de transporte capaz de operar a bajo pH, mientras que los receptores serían devueltos a la membrana (Figura 1.34) (Sabharanjak y Mayor, 2004).

Dado que, como hemos descrito, el transporte de folatos a través del FR- α se produce mediante endocitosis, la afinidad del FR- α por la unión de folatos viene definida por su constante de disociación (K_d); a diferencia del RFC, cuya afinidad de unión y transporte venía definida por la constante de Michaelis (K_m). El FR- α une folatos oxidados con una gran afinidad a las bajas concentraciones fisiológicas ($K_d < 1$ nM). La afinidad del FR- α por el 5-metil-THF y otros folatos reducidos, aunque es menor que por la forma oxidada del ácido fólico, sigue siendo elevada ($K_d = 1-10$ nM). Sin embargo, este receptor tiene una baja afinidad por el MTX ($K_d > 100$ nM) (Rijnboutt *et al.*, 1996). Esta capacidad de transportar folatos con una alta afinidad ha llevado a los investigadores a postular que la sobreexpresión de FR- α en tumores podría conferir una ventaja de crecimiento al facilitar la captación de folato a las bajas concentraciones presentes en el suero (Kelemen, 2006).

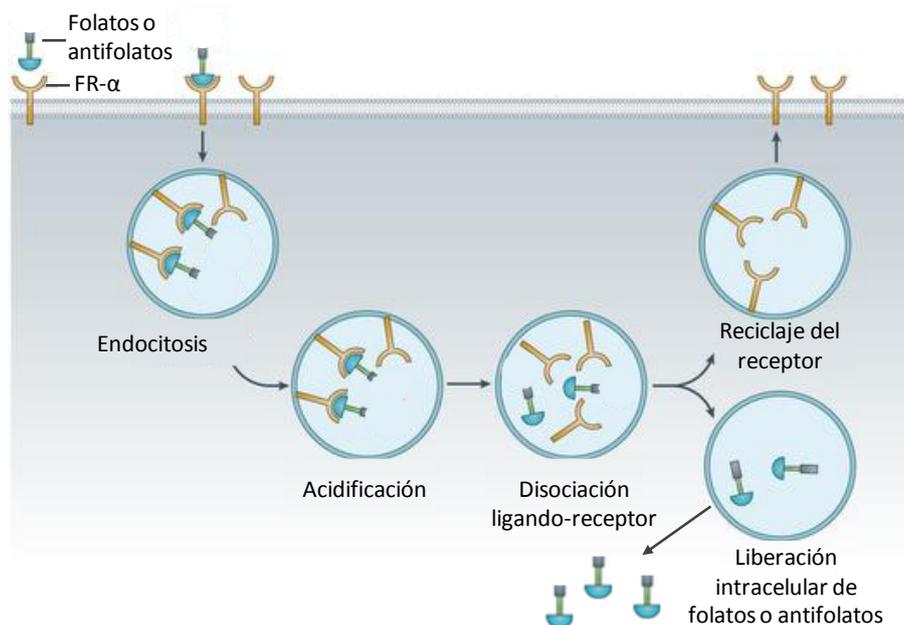


Figura 1.34. Mecanismo de transporte de folatos y antifolatos mediante endocitosis mediada por el FR- α .

1.3.5.3. Transportador de Folato Acoplado a Protones

El transportador de folato acoplado a protones (PCFT por sus siglas del inglés *proton coupled folate transporter*) es un transportador de folatos que muestra una actividad óptima a bajo pH. Su gen está localizado en el cromosoma 17q11.2 y consiste en cinco exones que codifican una proteína de 459 aminoácidos que presenta dos sitios de glicosilación (Asn58 y Asn68) (Zhao *et al.*, 2011). La

función principal de este transportador es mediar la absorción de folatos a través del borde en cepillo de la membrana apical de las células del intestino delgado, así como a través de la membrana de los plexos coroideos hacia el líquido cefalorraquídeo (Zhao y Goldman, 2013). Pero además, existen evidencias de que el PCFT podría mediar la salida de folatos desde los endosomas acidificados, donde este receptor colocaliza con el FR- α (Zhao *et al.*, 2009). El PCFT también se expresa en altos niveles en el riñón, el hígado, la placenta y el bazo; y, en menor medida, en el cerebro, los testículos y el pulmón. Además de en estos tejidos sanos, se ha descrito la expresión del PCFT en numerosos tumores humanos (Qiu *et al.*, 2006).

El PCFT presenta una alta afinidad por la forma oxidada del ácido fólico, el 5-metil-THF y el 5-formil-THF a pH 5.5 ($K_m = 1-5 \mu\text{M}$) y muestra una gran afinidad por un antifolato de nueva generación denominado pemetrexed ($K_m=0.2-0.8$). La afinidad por sus sustratos desciende a medida que aumenta el pH, pero también es capaz de funcionar, aunque con una actividad limitada, a pH fisiológico (Zhao *et al.*, 2008).

En la actualidad, se está desarrollando una nueva clase de antifolatos que son sustratos altamente específicos para el PCFT pero tienen una baja afinidad por el RFC. Aunque el PCFT está ampliamente expresado, su actividad es limitada al pH fisiológico de los tejidos sanos en los que, además, el transporte preferente de folatos está mediado por el RFC. Sin embargo, su actividad sería óptima en el microambiente tumoral donde el pH es ácido debido a la glucólisis anaerobia, por lo que el transporte de estos fármacos se llevaría a cabo de forma preferente en el tumor, reduciéndose así los efectos secundarios (Desmoulin *et al.*, 2012).

1.3.5.4. Exportación de antifolatos a través de proteínas de resistencia a multidrogas

Las proteínas de resistencia a multidrogas (MRP, del inglés *multidrug resistance proteins*) pertenecen a la superfamilia de transportadores ABC (del inglés *ATP-Binding Cassette*), constituida por 48 proteínas de membrana identificadas en humanos (Borst y Elferink, 2002). Estos transportadores utilizan la energía de la hidrólisis del ATP para sacar de la célula varias drogas citotóxicas y sustratos endógenos. Algunos miembros de esta familia de proteínas MRP son capaces de mediar la salida de ácido fólico, coenzimas del THF y antifolatos hidrofílicos como el MTX en su forma monoglutaminada (Assaraf, 2007). Aunque estos transportadores presentan una baja afinidad por los folatos y antifolatos, su alta capacidad de transporte hace que estén implicados en fenómenos de resistencia a los antifolatos. Estudios llevados a cabo por Hooijberg y colaboradores (1999) demostraron que la sobreexpresión de tres miembros de esta familia, MRP1, MRP2 y MRP3, conferían resistencia al MTX en varias líneas celulares. Ensayos con modelos animales también demostraron que MRP2 estaba involucrada en la exportación celular de MTX en tejidos de rata (Masuda *et al.*, 1997).

1.3.6. LA POLIGLUTAMINACIÓN COMO MECANISMO DE RETENCIÓN CELULAR DE FOLATOS Y ANTIFOLATOS

Los folatos están presentes en la sangre en concentraciones de 10-50 nM, siendo la forma más abundante el 5-metil-THF el cual se encuentra en forma monoglutamato. Una vez transportado al interior célula, los folatos y antifolatos clásicos como el MTX son convertidos en su forma poliglutinada por acción de la enzima folilpoliglutamato sintetasa (FPGS). Esta enzima cataliza la

adición secuencial de residuos de ácido glutámico, dependiente de Mg-ATP, al grupo γ -carboxilo de los folatos o antifolatos. Este proceso lleva consigo una serie de consecuencias que son importantes para el metabolismo de estos compuestos:

- Las formas poliglutaminadas de los coenzimas del folato y los antifolatos son polianiones impermeables a las bicapas lipídicas, por lo que son mejor retenidos en la célula.
- La mayoría de las formas poliglutaminadas de los cofactores del THF son mejores sustratos para las enzimas del ciclo del ácido fólico que las respectivas formas monoglutaminadas. Esto se debe a una mayor afinidad (menor K_m) o a un incremento de la actividad catalítica de estas enzimas (mayor V_{max}) o a una combinación de ambos parámetros (Schirch y Strong, 1989). Además, las formas poliglutaminadas del MTX, al igual que las formas oxidadas de los folatos poliglutaminados, son potentes inhibidores de TS, AICARTF, adenosina desaminasa y 5'-adenilato desaminasa (Allegra *et al.*, 1985; Baggott *et al.*, 1986; Allegra *et al.*, 1987). Esta capacidad de inhibición de diversas enzimas del ciclo del ácido fólico por estas formas poliglutaminadas aumenta la citotoxicidad de antifolatos como el MTX.
- Las formas poliglutaminadas de cadena relativamente larga (más de 3 residuos glutamato) de los coenzimas del THF y de los antifolatos no son sustrato de sistemas de transporte de folatos, incluyendo transportadores de entrada como el RFC y bombas de expulsión como las MRPs. Por tanto, las formas poliglutaminadas son mejor retenidas por las células (Zeng *et al.*, 2001; Wielinga *et al.*, 2005). Esta mayor retención intracelular de los antifolatos poliglutaminados supone un aumento de su actividad farmacológica gracias a que permite la inhibición sostenida a las enzimas del ácido fólico. Esta mayor retención de los folatos y antifolatos poliglutaminados tiene importantes consecuencias clínicas. De hecho, aquellos antifolatos poliglutaminables se administran con intervalos de tiempo más amplios, mientras que aquellos que no pueden ser poliglutaminados requieren una administración más frecuente debido a su menor retención y biodisponibilidad (Jackson *et al.*, 1984; Webber *et al.*, 1996; Jackman *et al.*, 1997).
- La poliglutaminación también es importante para la retención de los cofactores del THF en las mitocondrias, donde son cruciales para la biosíntesis de glicina. Esta retención es mediada por la FPGS mitocondrial que es una enzima codificada por el genoma nuclear (Lin *et al.*, 1993).

1.4. RESISTENCIA DEL MELANOMA A LAS TERAPIAS ANTICANCERÍGENAS

El melanoma es la forma más agresiva de cáncer de piel y es resistente a todas las modalidades de terapia anticancerígena disponibles en la actualidad, incluyendo inmunoterapia, radioterapia y quimioterapia (Soengas y Lowe, 2003). A día de hoy, el único tratamiento efectivo es la escisión quirúrgica de las lesiones tempranas, que tiene una tasa de éxito del 95% en estadios I/II y logra aumentar la supervivencia a largo plazo de los pacientes con afectación ganglionar (estadio III) (Balch *et al.*, 2001). A pesar de la multitud de ensayos clínicos encaminados a probar una amplia variedad de estrategias contra el melanoma, la supervivencia media de esta enfermedad en estadio IV sigue siendo de 6 a 10 meses (Jemal *et al.*, 2002). Desafortunadamente, las lesiones de melanoma pueden permanecer asintomáticas por largos periodos de tiempo e incluso debutar en estadio IV (metastásico) sin una lesión primaria identificable (Vijuk y Coates, 1998).

Un hecho que ha desconcertado tanto a los científicos básicos como a los clínicos durante décadas es que las células de melanoma adquieren simultáneamente la capacidad de escapar a los mecanismos de vigilancia del sistema inmune y de evadir la acción de diversos agentes citotóxicos que causan, por ejemplo, daño al ADN, desestabilización de microtúbulos o inhibición de la topoisomerasa. De hecho, tras la quimioterapia, raramente experimentan respuestas completas más de un 20% de los pacientes y el término “remisión” es prácticamente inexistente en melanoma. Por tanto, se piensa que en este tipo de tumor la resistencia no se produciría como consecuencia de la adquisición de alteraciones genéticas durante o después de la terapia, sino que sería una capacidad inherente al comportamiento maligno de las células de melanoma ya presente al diagnóstico. Diversos estudios genéticos, funcionales y bioquímicos apoyan la hipótesis de que las células de melanoma “nacen para sobrevivir” y que su comportamiento agresivo provendría de las características intrínsecas de sus precursores, los melanocitos. De hecho, mientras que la mayoría de las células responden a la radiación ionizante muriendo o arrojando su ciclo celular para intentar reparar el daño inducido en el ADN, los melanocitos se activan para secretar melanina y proteger a los queratinocitos y a las demás células de la epidermis de estos daños. Estas características intrínsecas de supervivencia se verían aumentadas por alteraciones adicionales adquiridas durante la progresión tumoral (Soengas y Lowe, 2003), tal y como se describió en el apartado 1.2.2.6. de esta memoria.

Puesto que esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de las bases moleculares del melanoma a los antifolatos, a continuación se exponen los mecanismos de resistencia a estos agentes descritos hasta la fecha.

1.4.1. MECANISMOS CLÁSICOS DE RESISTENCIA A ANTIFOLATOS

Desde el descubrimiento de sus propiedades antineoplásicas en 1947, los antifolatos han sido ampliamente utilizados en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. Sin embargo, no tardaron en aparecer estudios que describían la aparición de tumores resistentes frente a estos compuestos, bien de forma inherente o bien de forma adquirida tras el tratamiento. Entre ellos, destaca el melanoma como un tumor intrínsecamente resistente a los antifolatos (Kufe *et al.*, 1980). Los datos acumulados hasta la fecha han permitido identificar una serie de mecanismos en los distintos tipos de cáncer que,

individualmente o en su conjunto, confieren resistencia a los antifolatos. Estos mecanismos clásicos de resistencia son los siguientes (Assaraf, 2007):

1.4.1.1. Disminución de la captación de antifolatos por pérdida de función del RFC

Desde la incorporación del MTX en la clínica, diversos estudios han puesto de manifiesto que la resistencia a esta droga se asociaría a un fallo en el sistema de transporte controlado por el RFC (Assaraf y Schimke, 1987). Multitud de estudios preclínicos han puesto de manifiesto que estos defectos en el transporte del MTX se asocian con frecuencia a una disminución de la expresión del gen que codifica el RFC (*SLC19A1*), lo que implica una disminución de los niveles de este transportador (Moscow *et al.*, 1995; Moscow *et al.*, 1997; Rothem *et al.*, 2002; Stark y Assaraf, 2006; Wettergren *et al.*, 2005; Worm *et al.*, 2001). En los últimos años, la detección de fallos en el RFC se ha ampliado a estudios clínicos, en los que se han explorado los niveles y la función de este receptor en pacientes con cáncer. En estos estudios, se ha encontrado que el descenso en la expresión del RFC es un mecanismo de resistencia en la leucemia linfoblástica aguda, el osteosarcoma, el cáncer colorrectal y en linfomas (Ferreri *et al.*, 2004; Gorlick *et al.*, 1997; Rots *et al.*, 2000; Wettergren *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1998). En algunos casos, la bajada de su actividad transportadora se ha asociado a la presencia de mutaciones que afectan a la unión o al transporte de los antifolatos. A continuación, se describen varios mecanismos implicados en la pérdida de la actividad y la función del RFC:

- Mutaciones del RFC que afectan a su capacidad transportadora.

Poco tiempo después de que se clonara el gen *SLC19A1* (Dixon *et al.*, 1994; Moscow *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1994) se detectó la primera mutación funcional en una línea celular de leucemia de ratón (L1210) resistente al MTX (Brigle *et al.*, 1995). La presencia de una prolina en lugar de una alanina, en uno de los segmentos transmembrana, producía la ruptura de la estructura en hélice α de la proteína, afectando al transporte del MTX. En los últimos años se han detectado múltiples mutaciones del gen del RFC, muchas de las cuales, sobre todo las localizadas en las regiones transmembrana, tienen un gran impacto sobre la actividad transportadora del RFC. Una de las mutaciones más frecuentemente observada en líneas celulares humanas y de ratón resistentes al MTX implica el cambio del Glu45 por un residuo de lisina (Glu45Lys) en el primer segmento transmembrana. Podría pensarse que una disfunción del RFC afectaría fatalmente a la célula, debido a que no se podría transportar el ácido fólico y sus cofactores reducidos. Sin embargo, esta mutación se ha seleccionado probablemente debido a que, además de una pérdida de afinidad por el MTX, esta variante del RFC presenta una afinidad de 9 a 31 veces mayor por el ácido fólico y el leucovorín (Zhao *et al.*, 1998). Por lo tanto, esta mutación aumenta la resistencia al MTX en estas células, pero sin perjudicar el metabolismo del ácido fólico.

- Silenciamiento transcripcional del gen del RFC debido a la pérdida de función de algunos factores de transcripción que regulan su expresión.

Existen múltiples evidencias experimentales de que la expresión del gen del RFC está regulada a nivel transcripcional de una forma compleja por una serie de factores de transcripción, entre los que se incluyen los factores de transcripción Sp1, CREB, USF-1, AP-2, Ikaros, GATA y p53 (Liu *et al.*, 2004; Payton *et al.*, 2005; Whetstine *et al.*, 2002; Whetstine y Matherly, 2001). Por lo tanto, una disfunción en alguno de estos mecanismos de control genético también se asociaría con una pérdida de

actividad del RFC. En este sentido se ha publicado que una alteración postraduccional, que afecta los patrones de fosforilación de Sp1 y CREB, afecta a la expresión del RFC (Rothem *et al.*, 2004).

- *Silenciamiento transcripcional del gen del RFC mediante metilación de las islas CpG del promotor.*

El silenciamiento del gen del RFC debido a una metilación aberrante de su promotor fue observado por primera vez en células humanas de cáncer de mama con una resistencia innata al MTX (Worm *et al.*, 2001). Estas células eran altamente resistentes al MTX ya que no generaban transcritos codificantes para el RFC. Se encontró que el promotor de estas células estaba altamente metilado en unas zonas ricas en citosina y guanina (islas CpG). A raíz de este estudio, otros investigadores intentaron encontrar alteraciones en el patrón de metilación del gen del RFC en otras líneas celulares resistentes al MTX. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se encontró este silenciamiento génico mediante metilación del promotor (Ma *et al.*, 2000; Rothem *et al.*, 2004). Aunque este mecanismo no parece ser la forma principal de silenciamiento del gen *SLC19A1*, recientes estudios clínicos han detectado una metilación aberrante del promotor de este gen en casos de linfoma del sistema nervioso central bajo quimioterapia con altas dosis de MTX (Ferreri *et al.*, 2004).

- *Alteraciones en el número de copias del gen RFC y translocaciones que afectan a este gen.*

Su localización en la región telomérica del cromosoma 21, junto con la inestabilidad genómica intrínseca de las células tumorales, hace que se puedan producir alteraciones cromosómicas que afecten al número de copias o a la expresión del gen *SLC19A1*. Se ha observado disminución del número de copias de este gen debido a la pérdida alélica o a la delección completa del locus tras la selección con antifolatos (Kaufman *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2001). Además, también se han encontrado translocaciones del gen *SLC19A1* como consecuencia de la fusión de los cromosomas 21 y 22, así como amplificaciones y translocaciones con otros cromosomas como el 2 y el 15 (Ding *et al.*, 2001; Drori *et al.*, 2000a; Wong *et al.*, 1998).

1.4.1.2. Sobreexpresión de la DHFR y mutaciones que disminuyen su afinidad por antifolatos

Desde hace varias décadas, se han encontrado situaciones de resistencia a antifolatos en las cuales la expresión de la DHFR está alterada. En 1978 se observó, por primera vez, que la exposición a concentraciones crecientes de MTX provocaba la resistencia a esta droga en células en cultivo debido a una amplificación del gen de la DHFR (Alt *et al.*, 1978). Desde este descubrimiento, un gran número de estudios ha demostrado que la amplificación de la DHFR, debido a la inestabilidad cromosómica de las células tumorales, es un mecanismo común de resistencia a los antifolatos, observándose tanto en células en cultivo como en pacientes sometidos a quimioterapia con estos fármacos (Horns *et al.*, 1984; Trent *et al.*, 1984). La amplificación del gen de la DHFR puede ser estable o inestable, pero en ambos casos se produce un aumento importante del contenido intracelular de la proteína. Debido a que el MTX no se transporta por un sistema dependiente de concentración, la misma cantidad de la droga debe de inhibir una mayor cantidad de DHFR, lo que da lugar al fenómeno de resistencia.

Por otra parte, se ha descrito que la DHFR podría regular su propia expresión mediante unión a su propio ARNm (Tai *et al.*, 2004). La unión de la DHFR a su propio ARNm resultaría en la represión de su traducción a proteína. Se conoce que los inhibidores de la DHFR que se unen fuertemente a ella,

como el MTX, producen un cambio conformacional de la enzima que bloquearía la formación del complejo DHFR-ARNm y, por lo tanto, en presencia de MTX se bloquea este mecanismo de represión traduccional y se incentivaría la traducción del ARNm de la DHFR (Bystroff y Kraut, 1991).

Otros estudios han demostrado que un fenómeno habitual, durante la amplificación de la DHFR, es la aparición de mutaciones que disminuyen la afinidad de esta enzima por el MTX (Albrecht *et al.*, 1972; Flintoff y Essani, 1980; Goldie *et al.*, 1980; Jackson *et al.*, 1976). Se identificó una DHFR modificada estructuralmente que difería de la DHFR silvestre en su pl (Haber *et al.*, 1981) y, posteriormente, se comprobó que esta alteración era debida a la mutación puntual Leu22Arg (Simonsen y Levinson, 1983). Esta alteración estructural de la DHFR disminuía drásticamente su interacción con el MTX, pero sin apenas afectar su unión al DHF o al NADPH, por lo que las células resultaban viables, pero con una alta resistencia al MTX. Otras mutaciones identificadas en la DHFR, con consecuencias similares, son Gly15Trp Leu22Phe, Phe31Trp o Phe31Ser (Melera *et al.*, 1984; Melera *et al.*, 1988; Miyachi *et al.*, 1995).

1.4.1.3. Mecanismos de resistencia asociados a defectos en la poliglutaminación de los antifolatos

Dado el papel clave de la poliglutaminación en la retención celular y en la citotoxicidad de los antifolatos, no resulta sorprendente que la disminución de la actividad FPGS sea uno de los principales determinantes de la resistencia en aquellos antifolatos poliglutaminables. Sin embargo, la discriminación entre un fallo en los sistemas de poliglutaminación y un defecto en el RFC resulta difícil en algunos casos, ya que una falta de transporte de los antifolatos también resulta en una baja poliglutaminación. En algunos estudios se ha observado una caída de la actividad FPGS no asociada a un descenso de su ARNm. Estos resultados sugieren que la falta de actividad podría estar relacionada con alteraciones postranscripcionales que produjeran una disminución de su traducción a proteína (Roy *et al.*, 1997) o con la presencia de mutaciones (Zhao *et al.*, 2000). En este último trabajo se encontraron mutaciones en varios residuos de la proteína, que daban lugar a una pérdida de su afinidad por los sustratos (ATP, folato y ácido glutámico). En otros casos, la falta de poliglutaminación no es debida a la alteración de la expresión, traducción o actividad de la FPGS. Se ha descrito que un aumento celular en los coenzimas del THF previene la poliglutaminación de folatos y antifolatos poliglutaminables (Tse y Moran, 1998). Según estos autores, en las células tumorales, que requieren altos niveles de coenzimas del THF, la poliglutaminación estaría inhibida, facilitándose así la exportación de los antifolatos.

1.4.1.4. Aumento de de la expresión de las MRPs

Las MRPs (MRP1 a MRP5) y la BCRP (acrónimo del inglés breast cancer resistance protein), además de transportar otros compuestos citotóxicos, también transportan coenzimas del THF y antifolatos hidrofílicos (entre ellos el MTX) hacia el exterior de las células (Assaraf, 2007), por lo que un aumento en la expresión de estas proteínas podría aumentar la resistencia celular a los antifolatos. Estos transportadores pueden transportar estos compuestos en distintos estados de poliglutaminación (entre uno y tres residuos glutamato). Sin embargo, hasta la fecha no se han encontrado líneas celulares resistentes a los antifolatos que sobreexpresen estos receptores.

1.4.1.5. Inactivación metabólica de los antifolatos

Desde hace años se conoce que el MTX es oxidado a 7-hidroxi-MTX (7-OH-MTX) en el hígado, en una reacción catalizada por la enzima aldehído oxidasa (Jacobs *et al.*, 1976). La reacción es relativamente rápida y la relación 7-OH-MTX/MTX en el plasma a las 28, 48 y 66 horas después de la inyección de MTX a niños con leucemia linfoblástica aguda aumenta en la proporción 2.4, 8.7 y 15.1, respectivamente (Rask *et al.*, 1998). Por lo tanto, en el plasma el 7-OH-MTX es la forma predominante a las 48 h de la inyección. Al igual que el MTX, el 7-OH-MTX es transportado al interior de las células a través del RFC y, una vez en el interior, el 7-OH-MTX es poliglutaminado por la FPGS. Sin embargo, el 7-OH-MTX tiene menos afinidad que el MTX por la DHFR y por otras enzimas del ciclo del ácido fólico, por lo que esta transformación sería un mecanismo de resistencia corporal (mediado por el hígado) a los antifolatos.

1.4.2. MECANISMOS DE RESISTENCIA A ANTIFOLATOS ESPECÍFICOS DEL MELANOMA

Los mecanismos generales de resistencia de las células tumorales a los antifolatos como el MTX han sido objeto de estudio intensivo desde el descubrimiento de las propiedades antineoplásicas de estos compuestos (Zhao y Goldman, 2003; Assaraf, 2007). Sin embargo, hasta hace unos años poco se sabía acerca de los mecanismos de resistencia al MTX específicos de las células de melanoma. Durante décadas, los mecanismos de resistencia del melanoma a esta droga se habían asociado con los mecanismos generales descritos en otros cánceres epiteliales, incluyendo la disminución de la captación de la droga por defectos en los sistemas de transporte, aumento de los niveles de DHFR y disminución de la tasa de poliglutaminación y, por tanto, de la retención intracelular de esta droga (Assaraf, 2007).

Recientemente se ha descrito un mecanismo de resistencia del melanoma frente a diversas drogas citotóxicas, incluido el MTX (Chen *et al.*, 2006; Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a; Xie *et al.*, 2009). Trabajos realizados por nuestro grupo y por otros grupos de investigación han proporcionado evidencias de que los melanosomas contribuyen a la resistencia del melanoma a diversas drogas citotóxicas gracias a que estos orgánulos secuestran estos fármacos y median su exportación. Concretamente, nuestro grupo de investigación describió que la endocitosis de MTX mediada por el FR- α facilitaba el secuestro de esta droga en los melanosomas y su expulsión al exterior celular, lo que reducía la acumulación intracelular de MTX (Figura 1.35) (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a).

Estos hallazgos sugieren que el MTX activa la maquinaria responsable de la biogénesis y el transporte de los melanosomas, pero el mecanismo por el cual esta droga controla estos procesos celulares es desconocido. Así, esta Tesis Doctoral se ha centrado en descifrar las bases moleculares de este mecanismo de resistencia con el objetivo de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares clave en el proceso, para lograr evadir la resistencia del melanoma al MTX.

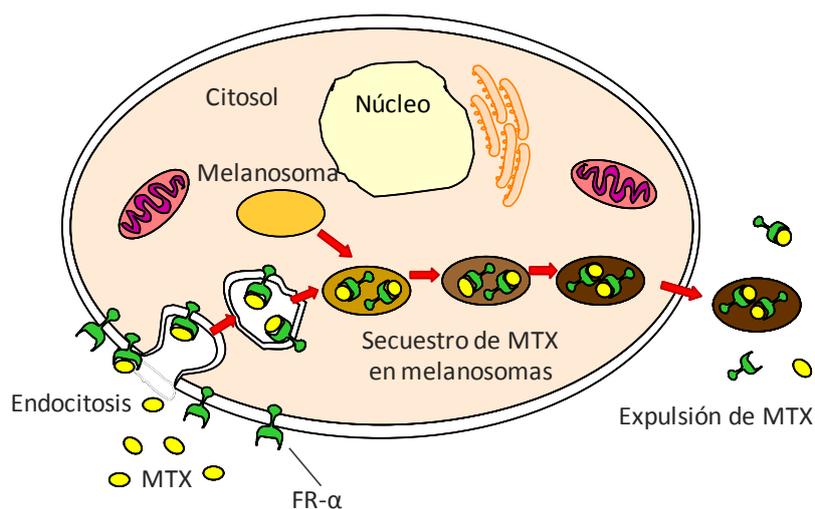


Figura 1.35. Mecanismo de resistencia del melanoma al MTX mediante su secuestro en melanosomas. La endocitosis mediada por el FR- α conduce al secuestro del MTX en los melanosomas y a su expulsión al exterior celular.

1.4.2.1. Implicaciones de la expulsión de MTX sobre la división celular y el metabolismo del ácido fólico

Los trabajos realizados por nuestro grupo de investigación (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a) pusieron de manifiesto que las células de melanoma eran resistentes a la apoptosis inducida por MTX pero respondían a esta droga arrojando su crecimiento. Por tanto, la baja acumulación de MTX intracelular provocada por la expulsión de la droga hacía que este fármaco se comportara como citoestático en lugar de citotóxico sobre las células de melanoma. Un efecto citoestático similar se observó al hacer crecer células de melanoma murino B16-F10 en un medio bajo en fólico. Estos resultados sugerían que el MTX podría inducir una reducción en los niveles de coenzimas reducidos del folato, reduciendo su transporte a través del FR- α y compitiendo con ellos por el transporte mediado por el RFC. Las células de melanoma podrían ser muy sensibles a la disminución de los coenzimas del ácido fólico y, en esta situación, podrían entrar en un estado latente. Esta forma de melanoma sería altamente resistente al MTX, dado que la mayor efectividad de los antifolatos se produce sobre células que se están dividiendo activamente y que, por tanto, necesitan sintetizar ADN continuamente.

Además, la sobreexpresión de DHFR observada en células tratadas con MTX (Kufe *et al.*, 1980) podría representar un mecanismo adaptativo que les permitiría sobrevivir a una baja concentración intracelular de folato, al facilitar el reciclaje de los coenzimas reducidos del ácido fólico, para mantener otras funciones celulares dependientes de estas biomoléculas. Esta forma latente de melanoma sería crítica para la resistencia al MTX *in vivo* ya que, aunque la quimioterapia con MTX podría inicialmente detener el desarrollo del tumor, las células de melanoma podrían reiniciar su crecimiento tras el aclaramiento de la droga del cuerpo del paciente (Branda *et al.*, 1988). De hecho, experimentos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio demostraron que la eliminación del MTX del medio de cultivo permitía la reanudación del crecimiento de células de melanoma que habían arrojado su división tras varios días de tratamiento con MTX (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a).

1.4.2.2. Los melanosomas como mediadores de la resistencia del melanoma al MTX

Los melanosomas son orgánulos especializados de las células pigmentadas en los cuales se produce la síntesis, el almacenamiento y el transporte de la melanina. Dado que estos orgánulos comparten ciertas características con los lisosomas (contienen hidrolasas ácidas y proteínas de membrana asociadas a los lisosomas), fueron incluidos en la familia de orgánulos relacionados con los lisosomas o LRO (acrónimo del inglés *lysosome-related organelles*) (Orlow *et al.*, 1995). Sin embargo, el análisis proteómico de los melanosomas ha demostrado que estos orgánulos presentan componentes procedentes de varios compartimentos celulares: el retículo endoplasmático, las vesículas recubiertas, los lisosomas y los endosomas. (Kushimoto *et al.*, 2001; Basrur *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2006). Por ello, actualmente se piensa que estos orgánulos derivan de endosomas tempranos que sufren una maduración específica y única de este tipo celular en la cual incorporan una serie de proteínas estructurales y enzimas procedentes de dichos compartimentos. En este proceso de maduración se pueden distinguir cuatro estadios morfológicos (I-IV). Los melanosomas en estadios I y II carecen de pigmento pero se caracterizan por la presencia de unas fibrillas proteicas que empiezan a formarse en el estadio I y cuya formación se completa en el estadio II. Una vez que estas estriaciones fibrilares están completamente formadas, comienza la síntesis de melanina. Las melaninas se depositan en las fibras, de manera que producen su engrosamiento y su oscurecimiento en los melanosomas en estadio III hasta que, en el estadio IV, la estructura interna está totalmente enmascarada por el pigmento (Figura 1.36; A) (Marks y Seabra, 2001).

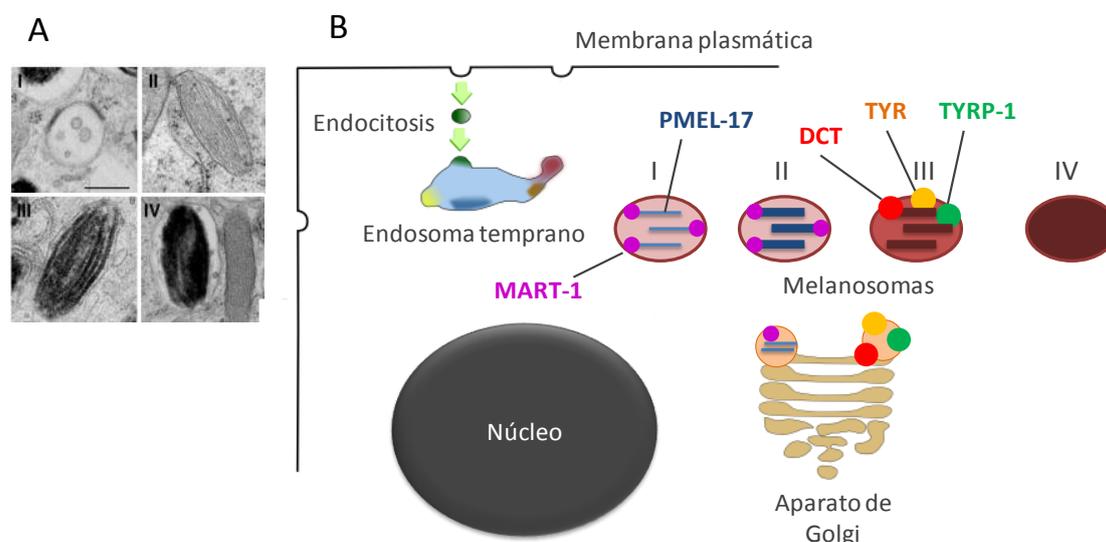


Figura 1.36. (A) Micrografía electrónica de transmisión de melanosomas en los distintos estadios de maduración (I-IV). (B) Esquema del proceso de formación y maduración de los melanosomas a partir de endosomas tempranos, indicando los elementos que se incorporan en cada estadio del proceso madurativo.

Los componentes estructurales y la maquinaria enzimática son sintetizados por los melanocitos e incorporados a los melanosomas a medida que se produce la maduración de los mismos. En los estadios I y II se incorpora al melanosoma la proteína PMEL17 (también conocida como gp100 o SILV), la cual es el componente estructural de la matriz fibrilar sobre la que se depositarán las melaninas. Otro componente estructural importante es la proteína Melan-A o MART-1 que forma un complejo con PMEL17 y regula su expresión, su estabilidad, su procesamiento y su tráfico

intracelular, así como la formación de las fibrillas (Hoashi *et al.*, 2005). Las enzimas responsables de la síntesis de melanina TYR, TYRP1 y DCT, se incorporan y aumentan su abundancia en los melanosomas en estadio III y IV (Figura 1.36; B) (Raposo *et al.*, 2001; Raposo y Marks, 2007).

Como se ha descrito anteriormente, los trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el atrapamiento del MTX en los melanosomas se produce como consecuencia de la endocitosis mediada por el FR- α (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009a). Para probar la importancia de este proceso en la resistencia del melanoma a los antifolatos, se silenció la expresión del gen *PMEL17* que, como hemos visto, juega un papel esencial en la biogénesis de melanosomas. El silenciamiento de esta proteína produjo un notable incremento en la sensibilidad de las células de melanoma al MTX, favoreciendo la inducción de apoptosis por esta droga. Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de Xie y colaboradores (2009), quienes proporcionaron la primera evidencia directa de que la disrupción de la biogénesis de melanosomas mediante la mutación de *PMEL17* sensibilizaba a las células de melanoma frente al cisplatino. Estas observaciones apoyan fuertemente la hipótesis de que la biogénesis de melanosomas es una especialización de la ruta endocítica (Raposo y Marks, 2007). Sin embargo, el mecanismo exacto por el cual el MTX induce este tráfico anormal de endosomas en las células de melanoma, que favorece su propia expulsión, es desconocido.

El factor de transcripción MITF como regulador clave de la melanogénesis.

Como se ha descrito en el apartado 1.2.2.6. de esta memoria, el factor de transcripción MITF es el regulador clave del desarrollo, diferenciación, función y supervivencia de los melanocitos, así como un oncogén en melanoma (Levy *et al.*, 2006). Durante los últimos años se han descubierto más de 40 genes diana de este factor de transcripción (Cheli *et al.*, 2010). Entre los genes implicados en la diferenciación melanocítica, MITF regula la expresión de las tres enzimas responsables de la síntesis de melaninas: TYR, TYRP1 y DCT (Yasumoto *et al.*, 1994; Yasumoto *et al.*, 2005). También regula la expresión de las proteínas estructurales de los melanosomas MART-1 y PMEL17 (Du *et al.*, 2003), así como de proteínas implicadas en el transporte de los melanosomas, como la proteína Rab-27A (Chiaverini *et al.*, 2008). Dada la capacidad de MITF de regular tanto la biogénesis como el transporte de melanosomas, el apartado 4.3 de esta Tesis Doctoral está centrado en el estudio del posible papel de este factor de transcripción en el mecanismo de resistencia del melanoma al MTX descrito anteriormente.

1.4.2.3. El transporte de melanosomas y la resistencia al MTX

Una vez que concluye su maduración, los melanosomas se unen a los microtúbulos en la región perinuclear (donde son sintetizados) y se transportan hacia la periferia celular mediante un mecanismo dependiente de kinesina. Se ha descrito también un movimiento retrógrado, desde la periferia hacia la región perinuclear, mediado por la proteína motora dineína. Una vez en la periferia celular, los melanosomas se anclan a los filamentos de actina a través de la proteína Rab-27A, una GTPasa localizada en la membrana melanosomal. Esta proteína Rab-27A se une, a través de la proteína efectora Slac2-a (también llamada melanofilina o Mlph), a la proteína motora Miosina Va (MyoVa) que es la responsable del movimiento de los melanosomas a lo largo de los filamentos de actina (Figura 1.37) (Barral y Seabra, 2004).

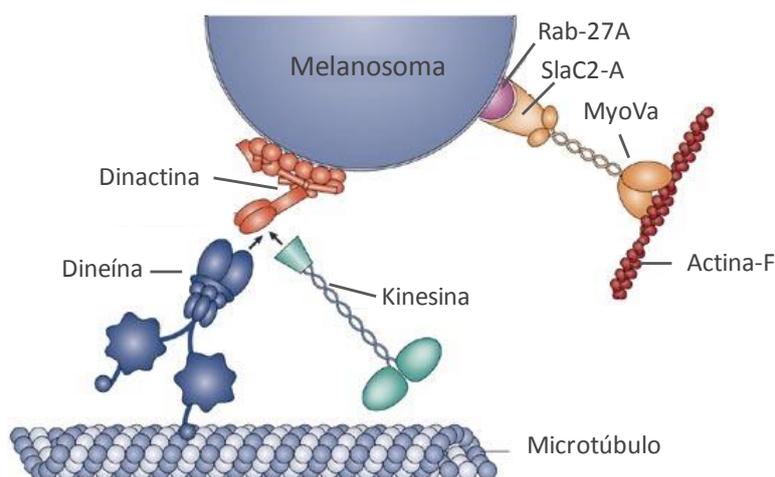


Figura 1.37. Esquema del proceso de transporte de melanosomas, indicando las distintas proteínas implicadas.

Mutaciones en cualquiera de estos genes causan el síndrome de Griscelli, una rara enfermedad hereditaria autosómica recesiva de desarrollo temprano que se caracteriza principalmente por hipopigmentación de la piel y un fenotipo de cabello plateado debido a que la pérdida de la función de cualquiera de estas proteínas provoca la interrupción del transporte melanosomal y una acumulación de melanosomas en la región perinuclear de los melanocitos. Existen tres subtipos de esta enfermedad, tipo I, tipo II o tipo III, dependiendo de si el gen afectado es *MYO5A*, *RAB27A* o *MLPH*, respectivamente. Dependiendo del subtipo, la hipopigmentación puede ir acompañada de inmunodeficiencia (en el tipo II) o de disfunción neurológica (en el tipo I) debido a que estas proteínas también participan en el transporte de vesículas en el sistema inmune y el sistema nervioso (Van Gele *et al.*, 2009). La sobreexpresión en melanocitos de proteínas portadoras de mutaciones que disrumen la formación del complejo Rab-27A-SlaC2-a-MyoVa provoca una agregación perinuclear de melanosomas similar a la observada en el síndrome de Griscelli (Pastural *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 2000; Menasche *et al.*, 2003a; Bahadoran *et al.*, 2003 Westbroek *et al.*, 2004).

Rab-27A

El gen *RAB27A* se localiza en el cromosoma 15q21. La proteína Rab-27A es un miembro de la superfamilia RAS de proteínas G monoméricas que engloba a múltiples GTPasas pequeñas que tienen un papel esencial en la regulación de una amplia variedad de procesos, incluyendo el transporte vesicular, la diferenciación celular y la motilidad (Corbeel y Freson, 2008; Seabra *et al.*, 2002). Como el resto de miembros de esta familia, Rab-27A tiene la capacidad de actuar como un interruptor molecular mediante la alternancia entre dos conformaciones: a través de la unión de GTP la proteína adoptaría un estado activo, mientras que la hidrólisis de GTP a GDP la devolvería a su forma inactiva.

En melanocitos, un factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) denominado RAB3GEF es el responsable de la activación de Rab-27A (Figueiredo *et al.*, 2008). Además, Rab-27A es prenilada en dos residuos de cisteína localizados en el N-terminal por la enzima Rab geranylgeranyl transferasa y es a través de estos grupos prenilo por donde se ancla a la membrana del melanosoma. Esta proteína también participa en la liberación de los gránulos de los linfocitos T citotóxicos, lo que explica la inmunodeficiencia observada en los pacientes con síndrome de Griscelli tipo II (Bizario *et al.*, 2004).

SlaC2-a (Melanofilina)

El gen *MLPH* se localiza en 2q37 (Menasche *et al.*, 2003a) y codifica para la proteína Mlph (acrónimo del inglés *melanophilin*) o SlaC2-a (acrónimo del inglés *synaptotagmin-like protein (Slp) lacking C2 domains-a*) que contiene un dominio N-terminal homólogo a Slp denominado SHD (acrónimo del inglés *Slp homology domain*) consistente en dos regiones conservadas de estructura potencial en α -hélice (SHD1 y SHD2) separadas por dos motivos de dedos de zinc. A diferencia de otras proteínas Slp, la familia SlaC2 (SlaC2-a/Mlph, SlaC2-b y SlaC2-c/MyRIP) carece de los dominios C2A y C2B en tándem en el C-terminal y, en su lugar, poseen dos dominios enrollados en espiral o *coiled-coil* (Nagashima *et al.*, 2002). Esta proteína actúa como proteína adaptadora dado que se une a la proteína Rab-27A a través de su dominio SHD N-terminal y, a las colas globulares de la proteína MyoVa a través de su mitad C-terminal (Fukuda *et al.*, 2002).

MyoVa

El gen *MYO5A* se localiza en 15q21 y codifica para una proteína que forma un homodímero constituido por dos cadenas pesadas idénticas. Cada una de estas cadenas consta de un dominio motor situado en el extremo N-terminal que constituye la cabeza de unión a la actina. A continuación, hay una región denominada “cuello” formada por seis repeticiones de una secuencia de aminoácidos denominadas motivos IQ, cada uno de los cuales se une a una cadena ligera (Cheney *et al.*, 1993). La formación del dímero se produce por el enrollamiento α -helicoidal de una cadena sobre la otra que da lugar a una estructura *coiled-coil* situada a continuación del dominio IQ. En el C-terminal se localiza la cola globular donde se halla el sitio de unión a la carga (Langford, 2002). El ARNm del gen *MYO5A* puede sufrir splicing alternativo en la región intermedia de la cola por medio del uso alterativo de tres exones denominados B, D y F. En humanos, existen seis isoformas de MyoVA en función del uso de estos exones (ABCDEF, ACDEF, ABCEF, ABCDE, ABCE y ACE), de los cuales los más abundantes en melanocitos son aquellos que contienen el exón F y solo las proteínas generadas por traducción de estos ARNm colocalizan con los melanosomas (Lambert *et al.*, 1998b; Wu *et al.*, 2002b; Westbroek *et al.*, 2003). Además, se ha demostrado que la presencia del exón F y de la cola globular es necesaria para el transporte de melanosomas, dado que ambos dominios se unen a la región intermedia de SlaC2-a (Fukuda y Kuroda, 2004; Hume *et al.*, 2006). De hecho, el silenciamiento de las isoformas de MyoVa portadoras del exón F mediante interferencia con ARNs en melanocitos normales produce una acumulación perinuclear de melanosomas, al bloquear el transporte de los mismos hacia el extremo de las dendritas. El silenciamiento de las isoformas portadoras del exón F induce además la inestabilidad de los complejos Rab-27A- SlaC2-a-MyoVa y la redistribución de Rab-27A y SlaC2-a hacia la región perinuclear de los melanocitos (Van Gele *et al.*, 2008).

Trabajos recientes realizados por Yoshizaki y colaboradores pusieron de manifiesto que la estimulación de los adipocitos con insulina provocaba la fosforilación mediada por Akt2 de la proteína MyoVa en el residuo 1650. Esta fosforilación aumentaba la capacidad de la MyoVa para interactuar con el citoesqueleto de actina y transportar las vesículas portadoras del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana para aumentar la captación de glucosa por estos tejidos. De hecho, tanto el silenciamiento génico de *MYO5A* como la expresión de una forma de MyoVa dominante negativa lograban atenuar el transporte de glucosa estimulado por la insulina y la translocación de las vesículas GLUT4 a la membrana de los adipocitos (Yoshizaki *et al.*, 2007). En vista

de estos hallazgos, el apartado 4.4 de esta Tesis Doctoral, se centra en el estudio del posible papel de Akt2 y MyoVa en la estimulación del transporte melanosomal por el tratamiento con MTX.

1.4.2.4. Implicación de la respuesta al daño en el ADN en la resistencia del melanoma.

Las células de mamífero presentan complejos mecanismos de respuesta frente al daño en el ADN denominados puntos de control o *checkpoints* que monitorizan la integridad del genoma en todas las fases del ciclo celular y responden al daño en el ADN desencadenando arresto del ciclo celular (Liang *et al.*, 2009). Este arresto del ciclo celular tiene como finalidad bien facilitar la reparación del ADN, o bien inducir muerte celular si este daño es muy grave. De esta manera, los mecanismos de *checkpoint* aseguran el mantenimiento de la integridad genética y protegen al organismo frente al desarrollo de cáncer (Bartek y Lukas, 2003). Sin embargo, estos mecanismos de respuesta al daño en el ADN se alteran durante el desarrollo de un tumor, produciéndose la pérdida del control del ciclo celular por parte de los *checkpoints*, inestabilidad genómica y defectos en la inducción de apoptosis (Kastan y Bartek, 2004).

Gran parte de las terapias anticancerígenas, incluida la quimioterapia con MTX, actúan directa o indirectamente causando daño en el ADN o interfiriendo con el procesamiento normal del ADN para inducir muerte celular. Una forma que tienen las células tumorales de volverse resistentes a esta modalidad de tratamiento es arrestar su ciclo celular para permitir una reparación del ADN suficiente como para mantener la viabilidad y pasar a la siguiente fase del ciclo. Esto no solo les permite escapar de la muerte celular, sino que incrementa la inestabilidad genómica (Cho *et al.*, 2005). En este sentido, la activación de los *checkpoints* ante la radioterapia o la quimioterapia genotóxica tendría un efecto protector para las células tumorales.

Vías de señalización de daño al ADN

En general, la red de señalización en respuesta al daño en el ADN consiste en dos vías paralelas que responden preferentemente frente a determinados tipos de daño y que están compuestas por sensores, transductores y efectores. En esta red, dos quinasas relacionadas con la fosfatidilinositol-3-quinasa, ATM (acrónimo del inglés *ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (acrónimo del inglés *ATM and Rad-3 related*), actúan como sensores y son las principales coordinadoras de dicha respuesta al daño en el ADN gracias a que fosforilan y activan a una gran variedad de moléculas responsables de la transducción y la ejecución de dicha respuesta (Liang *et al.*, 2009). Las principales transductoras de la respuesta al daño en el ADN son las serín/treonín quinasas Chk2 y Chk1 que actúan aguas abajo de ATM y ATR, respectivamente, fosforilando a diversas proteínas efectoras implicadas en el arresto del ciclo celular (*cdc25A*, *cdc25C*, *p53*, etc.), en la reparación del ADN (*BRCA1*, *p53*, *RAD51*, etc.) y en la apoptosis (*PML*, *p53*, *E2F1*, etc.) (Smith *et al.*, 2010).

ATR y Chk1 se activan principalmente por daño al ADN de cadena sencilla producido con frecuencia por agentes que interfieren con el funcionamiento de las horquillas de replicación (como los inhibidores de la topoisomerasa, la hidroxiaurea, la radiación UV o agentes que causan agotamiento de nucleótidos) o bien como consecuencia de la actuación de los mecanismos de reparación. Esta vía actúa principalmente durante los *checkpoints* de G1/S y G2/M (Tse *et al.*, 2007). Cuando aparecen moléculas de ADN de cadena sencilla, éste es rápidamente recubierto por RPA (acrónimo del inglés *replication protein A*) y estas estructuras reclutan a ATR en estos focos de daño gracias a la proteína adaptadora ATRIP (acrónimo del inglés *ATR interacting protein*). Se piensa que la

activación de ATR no implica su autofosforilación, sino que, una vez localizada en los focos de daño, ATR se activa por interacción con la proteína TopBP1 que se localiza en las regiones de intersección entre ADNsc y ADNdc. Esta activación es regulada por interacción entre TopBP1 y el complejo RAD9-Hus1-RAD1 (9-1-1), que forma un anillo alrededor de la cromatina en dicha intersección (Kumagai *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2007). Una vez activada ATR, es capaz de activar a la quinasa Chk1 mediante fosforilación en los residuos de serina 317 y 345 (Flynn y Zou, 2011). En esta activación es clave la proteína claspina que actúa aguas abajo de TopBP1 para dirigir la activación de Chk1 por ATR (Liu *et al.*, 2006).

ATM y Chk2 se activan principalmente frente a roturas de doble cadena (inducidas por agentes como la radiación ionizante o compuestos genotóxicos) y actúan durante todas las fases del ciclo celular. En ausencia de daños en el ADN la proteína ATM se encuentra formando homodímeros inactivos, mientras que la presencia de roturas de doble cadena en el ADN estimula su autofosforilación cruzada y la liberación de monómeros parcialmente activos (Bakkenist y Kastan, 2003). Estos monómeros de ATM son reclutados en los puntos de rotura doble en el ADN mediante su interacción con el complejo sensor MRN (constituido por las proteínas MRE11-RAD50 y NBS1) que estimula la completa activación de ATM y le proporciona una plataforma para actuar localmente sobre múltiples sustratos (Lee y Paull, 2007). Además, se cree que otras proteínas adicionales como p53BP1, MDC1 y BRIT1 podrían participar en este proceso y facilitar la activación de ATM. Una vez activa, ATM fosforila a la quinasa Chk2 en el residuo Thr68 lo cual conlleva a la dimerización transitoria de dos moléculas de Chk2 y a la autofosforilación cruzada, lo que conduce a su completa activación. Una vez activada, Chk2 se disocia de los puntos de daño en forma de monómero para fosforilar a sus múltiples sustratos (Figura 1.38) (Ahn *et al.*, 2002; Lukas *et al.*, 2003).

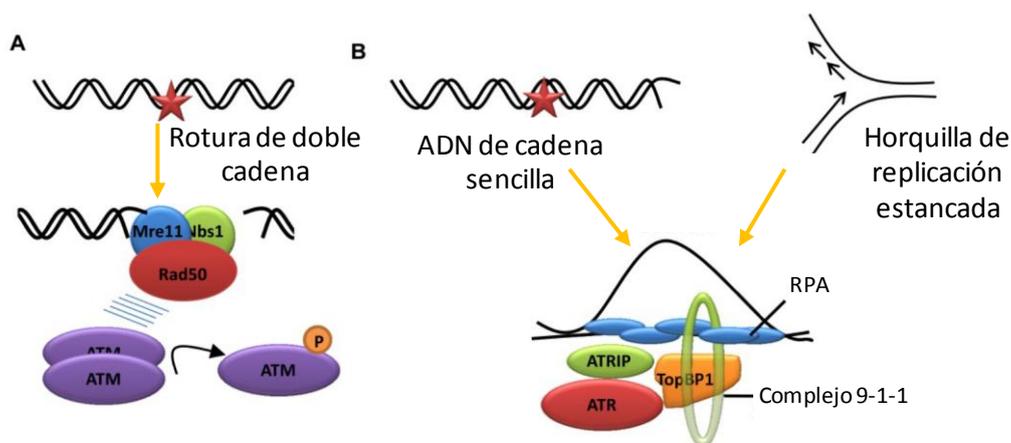


Figura 1.38. Esquema del proceso de activación de las quinasas ATR y ATM.

Entre los sustratos de ATM a nivel local destaca la histona H2AX, una variante de la histona H2A que forma parte de los nucleosomas, que es fosforilada por ATM originando γ -H2AX a lo largo de amplias regiones de cromatina que flanquean la lesión en el ADN. La aparición de esta γ -H2AX constituye el primer paso para el reclutamiento de proteínas de reparación del ADN en la zona de la lesión. Así, la cantidad de foci de γ -H2AX en el núcleo constituye un marcador de la intensidad del daño al ADN en forma de roturas de doble cadena (Kuo y Yang, 2008).

Aunque inicialmente la vía de ATM/Chk2 y la vía de ATR/Chk1 se describieron como dos rutas independientes, recientes estudios han puesto de manifiesto diversas interconexiones entre ellas (Hurley y Bunz, 2007) como por ejemplo, la fosforilación de Chk1 por ATM en respuesta a la radiación ionizante (Gatei *et al.*, 2003; Sørensen *et al.*, 2003).

- El checkpoint de G1/S

El *checkpoint* de G1/S evita que las células entren en fase S en presencia de daño en el ADN mediante la inhibición del inicio de la replicación. Si el daño al ADN es de doble cadena la activación de ATM conduce a la fosforilación de Chk2 la cual inicia el arresto en G1/S mediante la fosforilación de la fosfatasa Cdc25A que marca a esta proteína para su degradación proteolítica evitando que pueda eliminar los grupos fosfato inhibidores de la quinasa dependiente de ciclinas CDK2. La activación de los complejos CDK2-Ciclina E/A es necesaria para la activación de la proteína Cdc45 y la incorporación de esta última a los orígenes de replicación es el evento que marca el origen de la replicación. Por tanto, la inhibición de CDK2 bloquea la activación de los orígenes de replicación y, con ello, el paso de G1 a fase S. En el caso de la activación de la vía de ATR, una vez que se activa Chk1 ésta inicia igualmente el arresto en G1 mediante la fosforilación de Cdc25A (Figura 1.39) (Molinari *et al.*, 2000; Falk *et al.*, 2001; Bartek y Lukas, 2001).

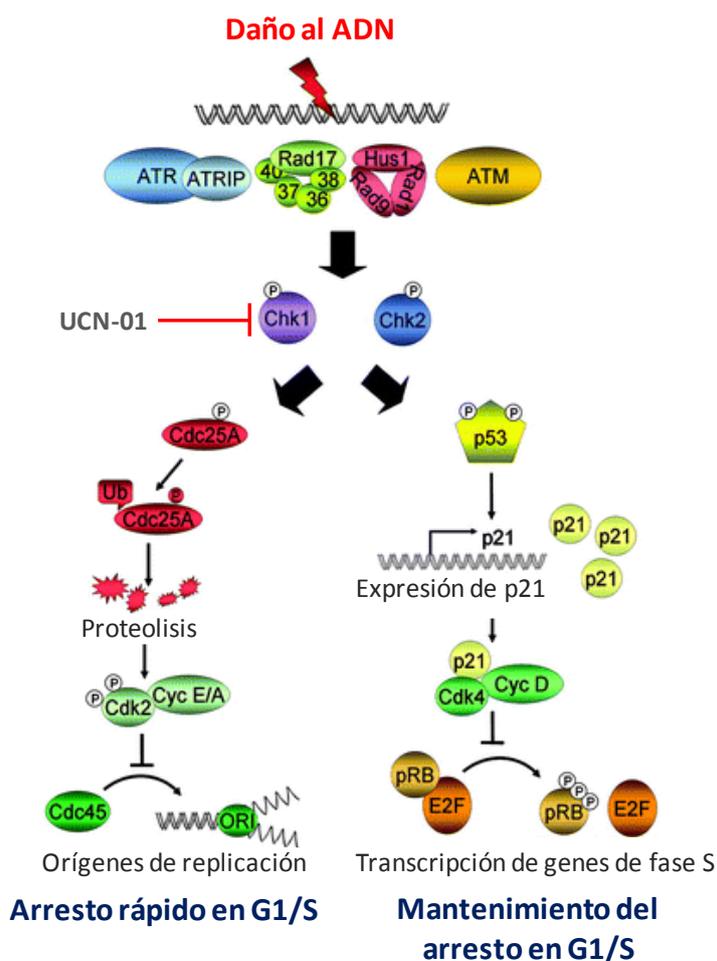


Figura 1.39. Mecanismos de arresto del ciclo celular en fase G1/S mediados por las vías de ATR/Chk1 y ATM/Chk2 e inhibición de la quinasa Chk1 por UCN-01.

Tanto si este arresto es iniciado por ATM/Chk2 o por ATR/Chk1, esta rápida respuesta inicial es seguida de un mantenimiento del arresto en G1/S mediado por p53 (Bartek y Lukas, 2001). En esta fase, ATM o ATR y Chk2 o Chk1 fosforilan a p53 (Banin *et al.*, 1998; Canman *et al.*, 1998; Chehab *et al.*, 1999; Kastan *et al.*, 2000; Maya *et al.*, 2001) lo cual provoca su disociación de Mdm2, una ubiquitina ligasa que normalmente marca a p53 para su degradación (Zhang y Xiong, 2001). Esto permite la acumulación y activación de p53, el cual induce la expresión de p21^{CIP1} que inhibe a los complejos ciclina D-CDK4 y ciclina E-CDK2, evitando así la fosforilación de RB. Esta fosforilación de RB se requiere para la liberación del factor de transcripción E2F que es el responsable de la inducción de la expresión de los genes necesarios para la fase S, por lo que p21^{CIP1} asegura el mantenimiento del arresto en G1/S (Figura 1.39) (Harper *et al.*, 1995; Waldman *et al.*, 1995).

- El checkpoint intra fase S

El *checkpoint* de fase S se activa por daños que se producen durante la replicación o por daños que escapan al *checkpoint* G1/S y provoca un bloqueo de la replicación. En este punto, se mantiene el mecanismo de bloqueo de nuevos orígenes de replicación mediado por CDK2-Cdc45 a través de las vías ATR/Chk1 y ATM/Chk2 descrito anteriormente. Pero además, se produce el enlentecimiento y la estabilización de las horquillas de replicación activas.

La proteína PCNA es una proteína esencial durante la replicación del ADN gracias a que forma un trímero que constituye un anillo deslizante alrededor del ADN que ancla a la ADN polimerasa al ADN aumentando su procesividad (Essers *et al.*, 2005). Cuando se activa el *checkpoint* de fase S se produce un enlentecimiento en la progresión de las horquillas de replicación mediante la inhibición de PCNA por p21^{CIP1} (Waga *et al.*, 1994). Pero además, este PCNA se reubica y pasa a controlar los mecanismos de reparación del ADN mediante su ubiquitinación por RAD6 (Hoegge *et al.*, 2002). Los mecanismos de estabilización y recuperación de las horquillas de replicación bloqueadas todavía no están claros, pero estudios recientes apuntan a que las proteínas BRCA1, BRCA2, PARP, RAD51 y FANCD2 juegan un papel clave en este proceso (Lomonosov *et al.*, 2003; Schlacher *et al.*, 2011; Ying *et al.*, 2012).

- El checkpoint de G2/M

Este *checkpoint* evita que las células lleven a cabo la mitosis en presencia de daños en el ADN. Dependiendo del tipo de daño, la activación de la vía ATM/Chk2 o de la vía ATR/Chk1 conduce a la fosforilación de la quinasa Cdc25A. De forma similar a lo que sucede en el *checkpoint* de fase G1/S, esta fosforilación marca a Cdc25A para su degradación, por lo que no puede eliminar fosfatos inhibidores a la CDK1 es clave en la progresión del ciclo desde G2 a M (Xiao *et al.*, 2003).

Supresión de los checkpoints como estrategia terapéutica

Como se ha descrito anteriormente, las células tumorales presentan alteraciones en los mecanismos de señalización y respuesta al daño en el ADN que les permiten utilizar el arresto del ciclo celular como un mecanismo de resistencia a las terapias anticancerígenas. Esto es debido a que este arresto del ciclo celular les permite una reparación del ADN suficiente como para mantener la viabilidad en presencia de alteraciones que normalmente desencadenarían la apoptosis celular (Cho *et al.*, 2005). Por ello, en los últimos años se ha planteado la hipótesis de que la inhibición de los *checkpoints* de fase S y G2/M podría sensibilizar a las células tumorales frente a las terapias

genotóxicas al permitir escalar el daño y acumular lesiones más graves capaces de desencadenar la muerte celular. En este sentido, se ha argumentado que la frecuente inactivación de p53 en los cánceres humanos supondría una ventaja para llevar a cabo esta estrategia debido a que las células tumorales deficientes en p53 carecen del arresto en G1 mediado por esta proteína, lo que las haría más dependientes de los *checkpoints* de fase S y G2/M que las células normales.

En la última década, esta hipótesis ha sido corroborada por numerosos estudios. Así, la inhibición de Chk1, mediante silenciamiento génico o mediante inhibidores farmacológicos como el UCN-01, ha demostrado la capacidad de potenciar los efectos citotóxicos de un amplio rango de agentes genotóxicos como se describe en el siguiente apartado de esta memoria.

UCN-01 como inhibidor de los puntos de control de daño al ADN

El UCN-01 (7-hidroxi-estaurosporina) fue aislado inicialmente a partir de cultivos de las cepas N-71 y N-126 de *Streptomyces sp.* como un inhibidor selectivo de la familia de proteína quinasas C (PKC) (Takahashi *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1989). No tardaron en aparecer estudios que demostraban la capacidad antitumoral de este compuesto, tanto en líneas celulares *in vitro* como en modelos animales (Akinaga *et al.*, 1991; Seynaeve *et al.*, 1993).

Aunque en un principio se pensaba que la PKC era la única diana del UCN-01, en el año 2000 Graves y colaboradores descubrieron que el UCN-01 es capaz de inhibir a la quinasa Chk1 que, como se ha descrito anteriormente, está involucrada en el control del ciclo celular durante la señalización del daño al ADN (Graves *et al.*, 2000). Estudios cinéticos y estructurales pusieron de manifiesto que la K_i del UCN-01 para Chk1 es de 5.6 μM (Zhao *et al.*, 2002). Cuando se produce un daño en el ADN, la quinasa Chk1 actúa fosforilando e inactivando a la fosfatasa Cdc25A que, de esta manera, no puede eliminar fosfatos inhibidores de CDK2 (en G1/S) o de CDK1 (en G2/M) por lo que se produce el arresto del ciclo celular en fase G1 o G2 para permitir la reparación del daño antes de pasar a la siguiente fase del ciclo. Por tanto, al inhibir a Chk1, el UCN-01 consigue eliminar estos puntos de control haciendo que las células progresen en la división celular a pesar de presentar daños en el ADN.

La capacidad del UCN-01 ha sido explotada para sensibilizar a las células tumorales frente a diversos agentes que inducen daño al ADN. Así, Wang y colaboradores demostraron que el UCN-01 aumentaba la citotoxicidad de la radiación gamma sobre células de linfoma humano CA-46 y de cáncer de colon HT-29. Pero además, el UCN-01 lograba sensibilizar a las células MCF-7 deficientes en p53 frente al cisplatino. En este mismo estudio, aquellas células MCF-7 con actividad normal de p53 mostraron una mayor resistencia a la anulación del punto de control de G2/M por el UCN-01 (Wang, *et al.*, 1996). Además, diversos estudios han puesto de manifiesto que la inhibición de Chk1 sensibiliza a las células frente a diversos agentes que causan estrés replicativo como el exceso de timidina, la hidroxiaurea, los inhibidores de topoisomerasa (como la camptotecina y la doxorubicina) y antimetabolitos como el 5-FU (Zhou y Bartek, 2004; Xiao *et al.*, 2003; Xiao *et al.*, 2005; Rodríguez y Meuth, 2006).

Estudios recientes en líneas celulares de cáncer de colon han puesto de manifiesto que el tratamiento con MTX provoca la activación de Chk1 y el arresto del ciclo celular en fase G1/S en las células supervivientes al tratamiento y que este paso constituiría la fase inicial en la adquisición de resistencia al MTX (de Anta *et al.*, 2006). Así, durante la realización de esta Tesis Doctoral, se planteó

la posibilidad de que el efecto citoestático del MTX sobre las células de melanoma estuviera causado por la activación de Chk1 y de que el tratamiento con UCN-01 fuera capaz de eliminar el arresto del ciclo celular originado por esta quinasa y sensibilizar a las células de melanoma frente al MTX.

Otras dianas farmacológicas del UCN-01: PKC, CDKs y PDK1

Como se ha dicho en el apartado anterior, la primera actividad farmacológica descrita para el UCN-01 fue la capacidad de inhibir a la familia PKC. Esta familia de quinasas se divide en tres subfamilias, con distintas isoformas cada una, denominadas convencionales (cPKC- α , - β 1, - β 2, - γ), nuevas (nPKC- δ , - ϵ , - η , - θ) y atípicas (aPKC- λ , - τ , - ζ). Los valores de K_i promedio para las distintas subfamilias resultaron ser de 1 nM para las cPKC, 20 nM para las nPKC y del orden de μ M para las aPKC, siendo la isoforma inhibida con mayor eficacia la cPKC- α , con una K_i de 0.44 nM (Mizuno *et al.*, 1995). No tardaron en aparecer estudios que demostraban la capacidad antitumoral de este compuesto tanto en líneas celulares *in vitro* como en modelos animales (Akinaga *et al.*, 1991; Seynaeve *et al.*, 1993).

Estudios realizados por Kawakami y colaboradores demostraron que el UCN-01 inhibe directamente la actividad enzimática de CDK2, 4 y 6 sobre la proteína RB *in vitro* con unos valores de IC_{50} de 42, 32 y 58 nM, respectivamente. Pero además, es capaz de inhibir parcialmente la fosforilación de la proteína RB *in vivo* sobre células de carcinoma de pulmón A549 a una concentración de 30 nM y, totalmente, a una concentración de 100 nM (Kawakami *et al.*, 1996). Dado que los complejos ciclina D-CDK4/6 y ciclina A/E-CDK2 fosforilan a RB para promover la transición G1-S, esta inhibición ralentizaría la transición G1-S (Matsushime *et al.*, 1992; Meyerson *et al.*, 1994; Xiong *et al.*, 1992; Devoto *et al.*, 1992; Koff *et al.*, 1991). A pesar de que el UCN-01 puede inhibir directamente a estas CDKs, se ha descrito que el UCN-01 induce la expresión de los inhibidores de CDKs p21^{CIP1} y p27^{KIP1}, lo cual va acompañado de la pérdida de actividad de las CDKs de fase G1-S y de desfosforilación de RB (Akiyama *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 2002; Facchinetti *et al.*, 2004).

Como se ha descrito en el apartado 1.2.2.6. de esta memoria, una de las vías de señalización clave en la transmisión de señales de supervivencia celular es la vía de PI3K/Akt en la que la quinasa PDK1 juega un papel esencial al fosforilar a Akt en la Thr308, lo cual es clave para su activación. Estudios realizados por Sato y colaboradores han puesto de manifiesto que el UCN-01 induce la desfosforilación e inactivación de Akt a través de la inhibición de PDK1. Estos trabajos demostraron que el UCN-01 era capaz de inhibir a PDK1 con unos valores de IC_{50} de 33 nM tanto *in vitro* como en líneas celulares *in vivo*. Esta inhibición de PDK1 por UCN-01 se observó también en xenoinjertos de tumores murinos y humanos en ratón. En estos trabajos, la sobreexpresión de una forma de Akt constitutivamente activa provocó una disminución de los efectos citotóxicos del UCN-01, sugiriendo que la citotoxicidad de este compuesto podría deberse, en parte, a la inhibición de la vía de PI3K/Akt (Sato *et al.*, 2002). Dado que, como se ha descrito en el apartado 1.4.2.3., la fosforilación de la proteína motora MyoVa por Akt activa el transporte de vesículas de GLUT4 en adipocitos, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se estudió la posibilidad de que la activación del transporte melanosomal inducida por el MTX se debiera a la activación de MyoVa mediada por Akt y de que el UCN-01 fuera capaz de bloquear este transporte a través de la inhibición de PDK1.

Ensayos clínicos con UCN-01

Los diversos efectos antineoplásicos del UCN-01 observados en modelos preclínicos, ha impulsado el estudio de la efectividad de este compuesto frente a diversas neoplasias en ensayos clínicos. Así, se ha probado este compuesto como único agente en pacientes con tumores sólidos refractarios para determinar sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas (Dees *et al.*, 2005). Además, se han realizado diversos ensayos clínicos para testar la efectividad del UCN-01 en combinación con fármacos como el 5-FU, el cisplatino, el carboplatino, el irinotecan, el topotecan, la citarabina, la prednisona y la fludarabina, entre otros, en pacientes con tumores sólidos, leucemias y linfomas avanzados. En estos ensayos clínicos los efectos secundarios más comunes asociados a este fármaco fueron dolor de cabeza, náuseas, vómitos, hiperglucemia e hipotensión (Kortmansky *et al.*, 2005; Lara *et al.*, 2005; Edelman *et al.*, 2007; Jimeno *et al.*, 2008; Welch *et al.*, 2007; Kummar *et al.*, 2010; Marti *et al.*, 2011).

En concreto, en un ensayo clínico fase I realizado con UCN-01 como único agente, un paciente con melanoma avanzado experimentó una respuesta parcial, lo que impulsó la realización de un ensayo clínico fase II para evaluar la actividad de este agente frente al melanoma refractario. A pesar de que este agente logró una estabilización de la enfermedad en cuatro de los diecisiete pacientes que formaron parte del estudio, no logró producir respuesta tumoral en ningún paciente, por lo que se consideró que este fármaco, como único agente, no presentaba suficiente actividad clínica para garantizar su uso en melanoma metastásico (Li *et al.*, 2012).

1.5. NUEVOS ANTIFOLATOS DERIVADOS DE LAS CATEQUINAS DEL TÉ

1.5.1. EL TÉ: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES

El té es una de las bebidas más consumidas en todo el mundo, con aproximadamente tres billones de kilogramos producidos y consumidos anualmente. Esta bebida se prepara a partir de la planta *Camellia sinensis* bajo la forma de té verde, negro u oolong principalmente (Khan y Mukhtar, 2007). En las últimas décadas, el té ha despertado la atención de los científicos y de los consumidores debido a sus propiedades beneficiosas para la salud en relación con diversas enfermedades. Estas propiedades beneficiosas se han atribuido a los compuestos polifenólicos que contiene esta planta, en particular a las catequinas, las cuales suponen entre un 15 y un 30% del peso seco de las hojas de la planta (Graham, 1992; Fujiki *et al.*, 2002). Estas catequinas están presentes en mayor cantidad en el té verde que en el negro o el oolong, debido a las diferencias en el procesamiento de las hojas. En el caso del té verde, las hojas frescas de la planta se cuecen al vapor y se secan para inactivar la enzima polifenol oxidasa, un proceso que mantiene esencialmente los polifenoles en sus formas monoméricas. Por otra parte, el té negro se produce mediante una fermentación prolongada de las hojas que da lugar a la formación de polímeros denominados terubiginas y teaflavinas. Entre ambos está el té oolong, que es un producto parcialmente fermentado que contiene una mezcla de polifenoles monoméricos y teaflavinas de alto peso molecular. Además de estas tres variedades principales, existen otras dos formas de té denominadas té blanco y té rojo. El té blanco se elabora de forma similar al té verde, pero empleando los brotes más tiernos de la planta, por lo que tiene un color verde pálido o blanquecino. La elaboración del té rojo es más similar al té oolong, experimentando una fermentación intermedia. Todas las variedades de té contienen cantidades significativas de cafeína (3-6%) que no se ven afectadas por los métodos de procesamiento (Graham, 1992).

Entre estas variedades, el té verde es el que ha demostrado mayores propiedades beneficiosas para la salud al preservar un mayor contenido en catequinas monoméricas. Estas catequinas son de varios tipos: epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC), epigalocatequina-3-galato (EGCG), catequina (C) y galocatequina (GC) (Figura 1.40). La catequina más abundante es el EGCG, la cual supone un 65% del contenido total en catequinas. Una taza de té verde contiene entre 100 y 200 mg de EGCG. La catequina y la galocatequina están presentes en cantidades traza (Graham, 1992). La mayor parte de las propiedades medicinales del té verde se asocian a las epicatequinas, más que a las catequinas.

Los efectos beneficiosos del té se han relacionado tradicionalmente con las propiedades antioxidantes de las catequinas polifenólicas. Pero además, se ha descrito que las catequinas del té tienen efectos sobre diversas dianas celulares y moleculares que intervienen en las vías de transducción de señales asociadas con la muerte y la supervivencia celular (Gouni-Berthold y Sachinidis, 2004). A nivel cardiovascular, el té verde previene la formación de placas ateroscleróticas (Chyu *et al.*, 2004) y tiene un efecto hipocolesterolemia (Yang y Koo, 2000). Entre las patologías asociadas con el envejecimiento y las enfermedades neurodegenerativas, el té verde ha demostrado proporcionar una protección significativa frente al desarrollo de Parkinson y de la enfermedad de Alzheimer, así como frente a daños isquémicos (Mandel y Youdim, 2004).

El té verde ha demostrado tener efectos antidiabéticos en modelos animales de resistencia a la insulina (Wu *et al.*, 2004b) y además promueve el gasto energético, por lo que se le atribuye un efecto protector frente a la obesidad (Dulloo *et al.*, 1999). El consumo de té también se ha relacionado con un efecto protector frente a varias enfermedades inflamatorias como la artritis, el asma y diversas enfermedades autoinmunes como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso, el síndrome de Sjögren y la psoriasis, entre otras. Asimismo, diversos estudios han puesto de manifiesto que el té verde presenta propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Yam, *et al.*, 1998; Mabe *et al.*, 1999; Hamilton-Miller, 2001; Stapleton *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2005; Kawai *et al.*, 2003).

Pero quizás, la cualidad por la que es más conocido el té verde es por sus propiedades anticancerígenas. Diversos estudios epidemiológicos, así como diversos modelos animales, han demostrado que el té verde tiene un efecto protector frente a varios cánceres entre los que están el cáncer de piel, de mama, de próstata y de pulmón. Estos efectos se correlacionan con estudios *in vitro* en los que se ha visto que los extractos de té verde son capaces de estimular la apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer de próstata, linfoma, colon y pulmón, entre otras (Mukhtar y Ahmad, 2000; Yang *et al.*, 2002). Además se ha demostrado que el té verde y el EGCG inhiben la invasión tumoral, tienen un papel antiangiogénico (Cao y Cao, 1999; Jung y Ellis, 2001) y antimutagénico (Wang *et al.*, 1989; Han, 1997), lo cual contribuiría también a la protección frente al cáncer.

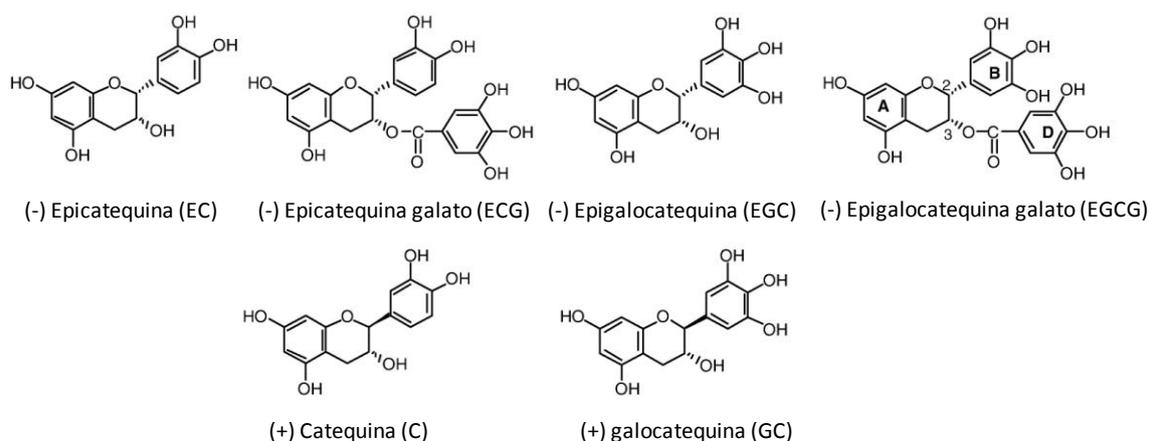


Figura 1.40. Estructura química de las catequinas del té.

1.5.2. LAS CATEQUINAS DEL TÉ COMO ANTIFOLATOS

A pesar de los esfuerzos realizados en las últimas décadas por comprender la actividad antitumoral del té, hasta hace unos años, todavía no se había descrito el mecanismo exacto por el cual éste ejerce sus propiedades antiproliferativas. En base a la observación de la similitud existente entre la estructura química de los antifolatos clásicos (como el MTX) y no clásicos (como la tetrahydroquinazolina (TQD) y algunos polifenoles del té, nuestro laboratorio comenzó a trabajar en la hipótesis de que las catequinas del té podrían actuar como inhibidores de la enzima DHFR.

Las catequinas comparten con estos inhibidores la estructura de dos anillos de 6 carbonos fusionados, unidos a un anillo bencénico mediante un enlace que contiene un heteroátomo en la posición 6 del ácido fólico y los antifolatos. Además, el EGCG presenta dos grupos OH fenólicos en la región A equivalentes a las aminas C2 y C4 del ácido fólico y los antifolatos, mediante las cuales se unen al residuo ácido en el centro activo de la enzima (Glu-30 en la DHFR humana). Las regiones B y C presentan una mayor flexibilidad, aunque es importante no modificar la posición de la cadena lateral unida a la posición 6 de los folatos y antifolatos o a la posición 3 de las catequinas, donde se encuentra unido por enlace éster el ácido gálico en las catequinas galato. La región D es la misma en los ésteres del gálico de las catequinas y en los antifolatos, sin embargo, la cadena lateral del glutámico (regiones E y F), característica de los antifolatos clásicos, no se encuentra en las catequinas. La mayor diferencia estructural entre las catequinas del té y los antifolatos, reside en la zona del trihidroxibenceno no unido por enlace éster, la cual no existe en los inhibidores ni en los sustratos de DHFR (Figura 1.41).

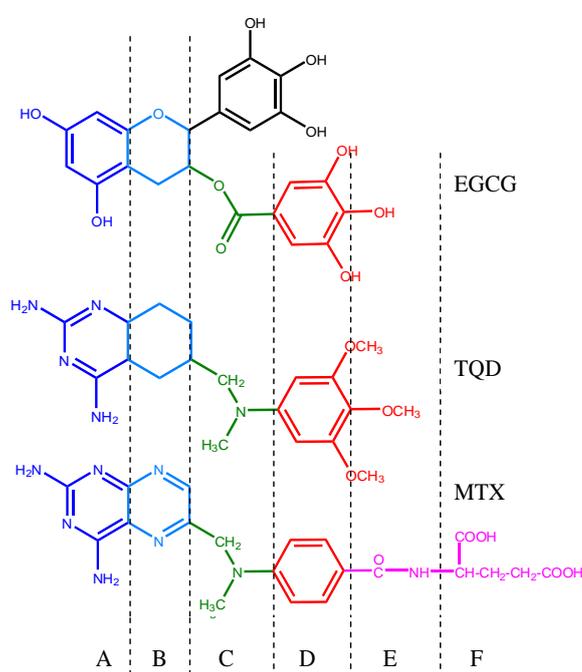


Figura 1.41. Comparación estructural del EGCG con el MTX (antifolato clásico) y con el TQD (antifolato no clásico).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los ésteres galato de las catequinas aisladas del té verde, como el EGCG y el ECG actúan como potentes inhibidores de la enzima DHFR *in vitro* a concentraciones similares a las encontradas en el suero y los tejidos de los bebedores usuales de té verde (0.1-1 μM) (Navarro-Perán *et al.*, 2005b). El EGCG mostró características cinéticas de un inhibidor de unión lenta para la reacción de reducción de DHF por la DHFR de hígado bovino. Sin embargo, mostró características de un inhibidor competitivo y reversible clásico en el caso de la DHFR de hígado de pollo. Estudios de modelaje estructural mostraron que el EGCG se puede unir a la DHFR humana en una orientación similar a la observada para un gran número de inhibidores (Figura 1.42) (Navarro Perán *et al.*, 2005a).

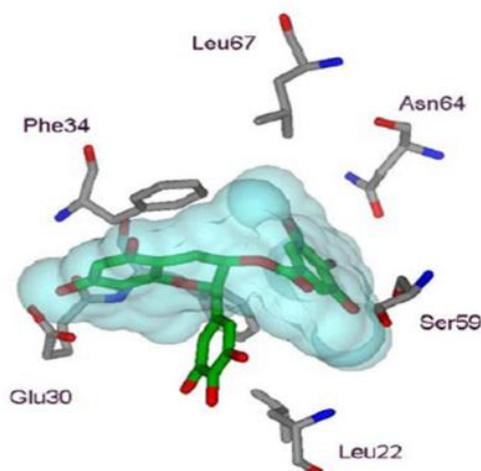


Figura 1.42. Modelo molecular de la unión del EGCG al sitio de unión del folato en la enzima DHFR humana. Los esqueletos carbonados de la molécula de EGCG y DHFR se muestran en verde y en gris, respectivamente.

Además, se llevaron a cabo experimentos con cultivos celulares para tratar de demostrar los efectos de la inhibición de la DHFR a nivel celular. En estos experimentos, el EGCG demostró tener una actividad antifolato capaz de inhibir el crecimiento de células de linfoma murino (L1210) y de células de adenocarcinoma de colon humano (CACO-2) (Navarro-Perán *et al.*, 2005a; Navarro-Perán *et al.*, 2007).

1.5.3. ANÁLOGOS SINTÉTICOS DE LAS CATEQUINAS: EL TMECG

A pesar de las excelentes propiedades de las catequinas del té, éstas presentan una baja disponibilidad *in vivo*, lo que supone una importante limitación (Nakagawa y Miyazawa, 1997). Los factores responsables de esta baja biodisponibilidad podrían estar relacionados con su baja estabilidad en soluciones neutras o ligeramente alcalinas y con su incapacidad de atravesar membranas (Hong *et al.*, 2002). En un intento por solucionar estos problemas de biodisponibilidad, nuestro laboratorio sintetizó un análogo del ECG, el 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina o TMECG (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2008).

1.5.3.1. El TMECG como una prodroga activada por tirosinasa en melanoma

Cuando se probó la actividad antiproliferativa del TMECG sobre varias líneas celulares, se pudo observar que este compuesto tenía una actividad mucho mayor sobre células de melanoma que sobre melanocitos normales y sobre líneas celulares de otros cánceres epiteliales como el cáncer de mama, de pulmón y de colon (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2008; Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009b). A continuación, nuestro grupo de investigación se centró en desvelar la causa de la elevada actividad del TMECG sobre las células de melanoma. Una de las diferencias más llamativas entre las células de melanoma y otras células epiteliales es que las primeras poseen el enzima tirosinasa, que es una fenol oxidasa que cataliza las reacciones clave en la ruta de síntesis de melaninas. Por tanto, nuestro grupo se planteó estudiar si la citotoxicidad del TMECG frente al melanoma podía estar mediada por una activación celular del TMECG catalizada por la enzima tirosinasa, dada la naturaleza fenólica de este compuesto.

Los resultados de estos trabajos mostraron que, efectivamente, la tirosinasa oxidaba al TMECG a su correspondiente o-quinona, la cual rápidamente evolucionaba a través de una serie de reacciones químicas a una quinona metide (QM), la cual mostraba una elevada estabilidad en un amplio rango de pH (Figura 1.43).

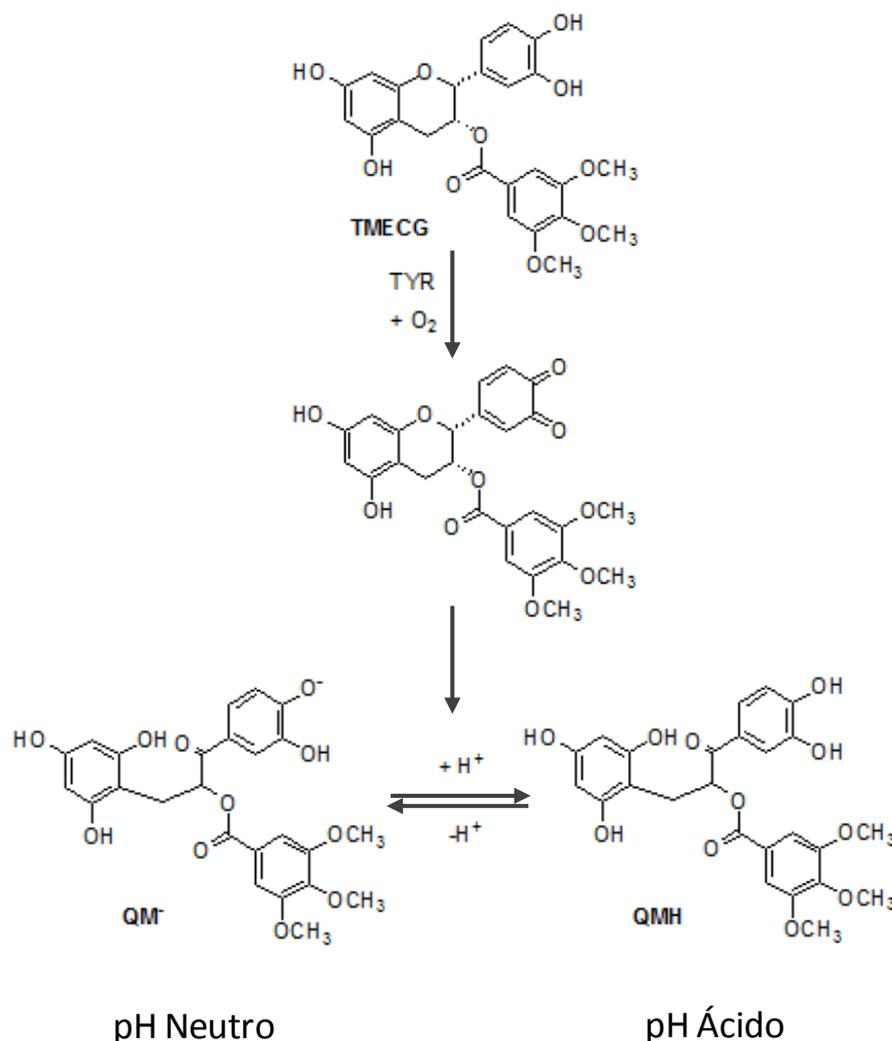


Figura 1.43. Esquema de la reacción de oxidación del TMECG por la enzima tirosinasa y de la formación de quinona metide.

El TMECG-QM resultó ser un potente inhibidor irreversible de la DHFR humana, por lo que la gran actividad de este compuesto sobre las células de melanoma podía ser explicada por la gran estabilidad de la quinona metide generada por la activación catalizada por la tirosinasa (Sánchez-del-Campo *et al.*, 2009b). Para explicar la irreversibilidad de la unión del TMECG-QM a la DHFR humana se llevaron a cabo experimentos de modelaje molecular *in silico*. El TMECG resultó unirse a la DHFR de un modo similar al descrito para el EGCG (Navarro Perán *et al.*, 2005a), con puentes de hidrógeno específicos que implicaban al Glu-30 del centro activo (Figura 1.44; A). Sin embargo, la estructura abierta de la QM aumentaba su flexibilidad molecular y adoptaba una conformación diferente en el centro activo de la DHFR humana (Figura 1.44; B). La QM mantenía el puente de hidrógeno con la cadena lateral del Glu-30, pero además establece tres nuevas interacciones.

El otro grupo fenólico del anillo A forma un puente de hidrógeno con el residuo Ile-7, mientras que los otros dos puentes de hidrógeno se establecen entre dos oxígenos de los grupos metoxi del anillo D y los residuos Ser-59 e Ile-60. La irreversibilidad del complejo DHFR-TMECG-QM quedaría explicada por la fuerte interacción entre la quinona metide y los distintos residuos de la proteína.

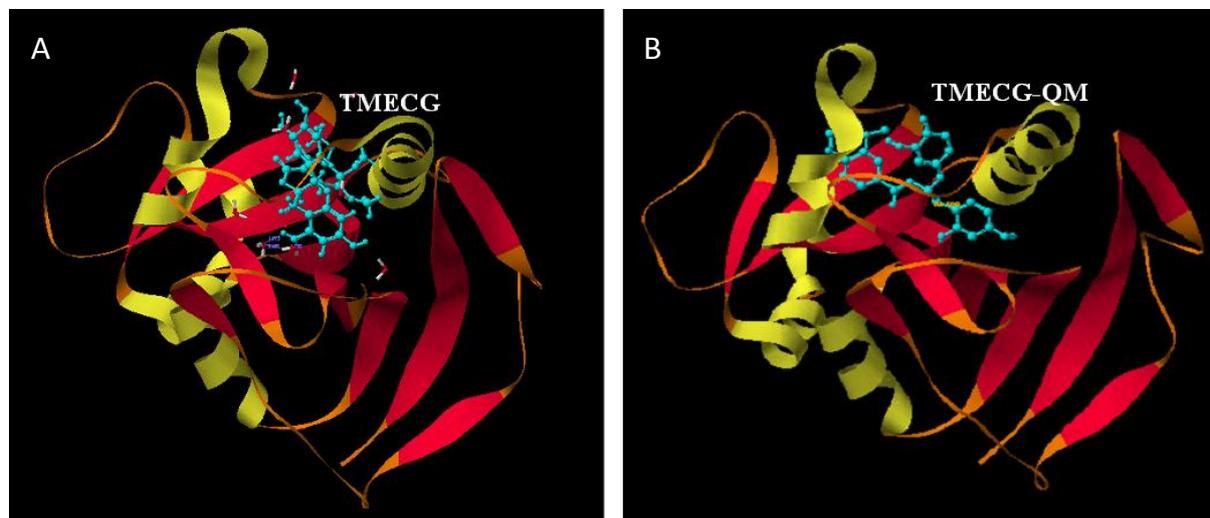


Figura 1.44. Modelo molecular de la unión del TMECG (A) y del TMECG-QM originado por acción de la tirosinasa (B) a la enzima DHFR humana.

Las prodrogas son compuestos que necesitan ser transformados para mostrar su actividad farmacológica y, generalmente, se clasifican en dos grupos: aquellas diseñadas para aumentar su biodisponibilidad y mejorar sus propiedades farmacocinéticas y aquellas diseñadas para ejercer sus propiedades antitumorales de forma local (Rooseboom *et al.*, 2004). Por tanto, el TMECG se puede considerar una prodroga contra el melanoma dado que muestra ambas características. Por una parte, la terapia con TMECG incrementaría su biodisponibilidad ya que esta droga podría alcanzar concentraciones elevadas en melanoma. Pero además, el suave efecto antifolato de la prodroga (TMECG), su activación específica a TMECG-QM en las células de melanoma y el hecho de que los antifolatos son mucho más activos en células cancerígenas que se dividen rápidamente que en células normales, hacen que este compuesto sea ideal para el tratamiento de esta patología.

1.5.3.2. Actividad del TMECG en líneas celulares y modelos animales de melanoma

El tratamiento de diversas líneas celulares de melanoma con TMECG a distintas concentraciones durante 7 días permitió demostrar que este compuesto es capaz de inducir la apoptosis en células de melanoma. Sin embargo, los melanocitos normales resultaron ser altamente resistentes a la apoptosis inducida por TMECG, lo que supone una gran ventaja de este agente antitumoral al reducirse los efectos sobre células sanas. Además, se estudió la actividad farmacológica del TMECG *in vivo* sobre melanomas inducidos por inyección subcutánea de células B16/F10 en ratones singénicos C57/B16. Los resultados mostraron que el tratamiento con TMECG lograba aumentar la supervivencia global respecto al grupo control. Además, el tratamiento con TMECG conseguía reducir tanto el crecimiento de los tumores primarios como el desarrollo de metástasis.

1.5.3.3. Mecanismo de acción del TMECG en melanoma

Dada la naturaleza hidrofóbica del TMECG, el mecanismo más probable de entrada en la célula es mediante difusión pasiva a través de la membrana plasmática a favor de gradiente de concentración (Figura 1.45). Esta independencia de transportadores de folato para su entrada, implicaría que el TMECG podría evitar los mecanismos de resistencia mediados por los sistemas de transporte (Ma *et al.*, 2000). De hecho, se comprobó que el tratamiento con TMECG provocaba una disminución en los niveles de RFC, lo que suponía una importante ventaja para su efecto antiproliferativo al reducir el pool intracelular de folato y, con ello, la competencia con los folatos naturales por la diana DHFR. Una vez en el interior celular, el transporte al interior del melanosoma a favor de gradiente facilitaría la oxidación por tirosinasa y su activación a TMECG-QM. Experimentos realizados en nuestro laboratorio demostraron que el TMECG-QM no interacciona con las melaninas, lo que evitaría el atrapamiento melanosomal. Dado el bajo pH de este orgánulo, la forma predominante sería la forma protonada, QMH, la cual dada su gran estabilidad y la ausencia de carga formal, podría salir del melanosoma al citosol (Figura 1.45).

Bajo las condiciones de pH ligeramente básico del citosol, la forma aniónica de la QM sería la forma predominante, por lo que este compuesto quedaría atrapado en el citosol de la célula debido a esta carga negativa. Este mecanismo de retención representaría una ventaja respecto a aquellos antifolatos que necesitan ser poliglutaminados para ser retenidos intracelularmente. Una vez en el citosol, TMECG-QM actuaría inhibiendo a la DHFR.

El hecho de que la tirosinasa esté altamente expresada en células de melanoma en comparación con los melanocitos normales, podría influir en el grado, la especificidad y la duración del efecto antifolato del TMECG-QM. Finalmente, los datos de la efectividad del TMECG en modelos de melanoma de ratón confirman la biodisponibilidad del TMECG para las células tumorales y evita, no solo los mecanismos de resistencia del melanoma a los antifolatos, sino que también evita los mecanismos relacionados con la activación corporal de la droga.

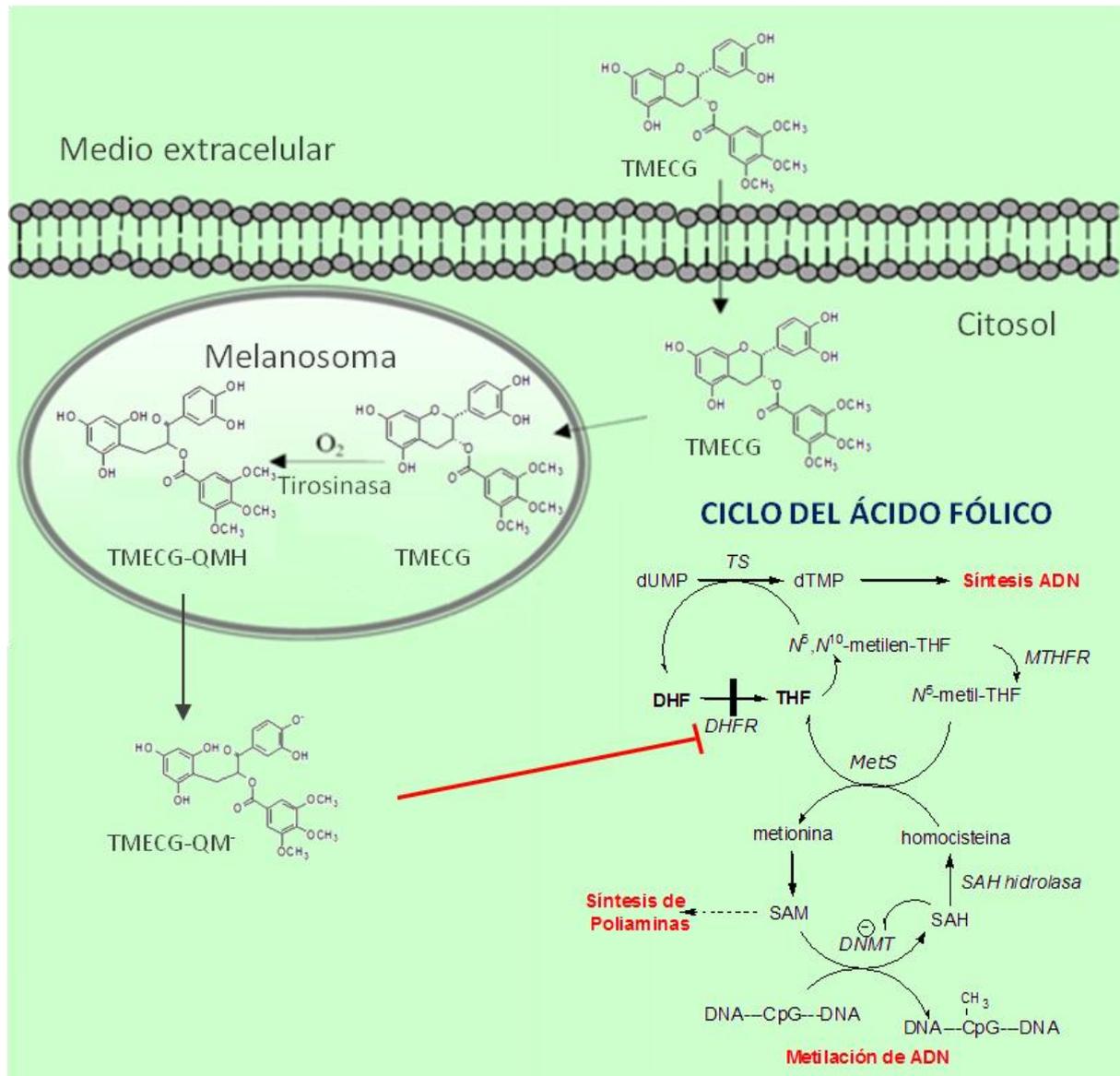


Figura 1.45. Esquema del mecanismo de acción del TMECG en células de melanoma.



CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

*Investigar es ver lo que todo el mundo
ha visto, y pensar lo que nadie más ha
pensado.*

Albert Szent-Györgi.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Recientemente, nuestro Grupo de Investigación ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia al metotrexato (MTX) según el cual, la endocitosis de este fármaco mediada por el receptor de fólculo α (FR- α) conduce a su secuestro en los melanosomas y a su expulsión al exterior celular, lo que reduce la concentración intracelular de MTX y hace que éste tenga únicamente un efecto citoestático, pero no citotóxico, sobre las células de melanoma.

Así, el **Objetivo General** de esta Tesis Doctoral fue el estudio de las bases moleculares de este mecanismo de resistencia del melanoma al MTX, y el diseño de estrategias terapéuticas combinadas para lograr evadir esta resistencia.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Según el mecanismo de resistencia descrito anteriormente, el MTX parecía estar induciendo un arresto del ciclo celular y activando tanto la síntesis de melaninas como la biogénesis y la exportación de melanosomas, pero los mecanismos moleculares subyacentes a estos efectos eran desconocidos. Así, los **Objetivos Específicos** de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Estudiar las bases moleculares del arresto del ciclo celular que protege a las células de melanoma de la apoptosis inducida por el MTX.
2. Estudiar las bases moleculares de la activación de la síntesis de melaninas y de la biogénesis de melanosomas en las células de melanoma tras el tratamiento con MTX.
3. Estudiar las bases moleculares de la activación del transporte de melanosomas inducida por el MTX en las células de melanoma.
4. Realizar una revisión de los mecanismos de resistencia al MTX específicos del melanoma descubiertos por nuestro grupo hasta la fecha, así como de las potenciales implicaciones clínicas de estos descubrimientos.
5. Diseñar estrategias terapéuticas encaminadas a eliminar el arresto del ciclo celular y favorecer la inducción de apoptosis de las células de melanoma por el MTX.
6. Utilizar el conocimiento de las bases moleculares de la activación de la síntesis de melaninas y la biogénesis de melanosomas para el desarrollo de una terapia combinada de MTX con algún fármaco activado específicamente por las enzimas melanogénicas.
7. Diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear el transporte de melanosomas y, con ello, la expulsión del MTX secuestrado en estos orgánulos, con el fin de aumentar los niveles de esta droga en el interior de las células de melanoma.

- 8.** Realizar una revisión divulgativa en castellano de los descubrimientos realizados por nuestro grupo de investigación para acercar nuestro trabajo al público general.

CAPÍTULO 3



TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN

*No es porque las cosas sean difíciles
por lo que no nos atrevemos, sino que
es porque no nos atrevemos por lo
que son difíciles.*

Séneca.

3. TÉCNICAS E INSTRUMENTACIÓN

3.1. MODELOS EXPERIMENTALES

3.1.1. CULTIVOS CELULARES

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron diversas líneas celulares continuas, así como cultivos celulares no inmortalizados con bajo número de pases. Además se establecieron cultivos celulares primarios a partir de melanomas humanos y de ratón. El mantenimiento y los experimentos con cultivos celulares se llevaron a cabo en las instalaciones de la Sección de Cultivo de Tejidos (SCT) de la Universidad de Murcia utilizando cabinas de flujo laminar vertical de seguridad biológica y química clase II (modelo Cytostar de Telstar) que garantizan tanto la seguridad del operador y del ambiente exterior como la esterilidad del cultivo. Las células se mantuvieron en incubadores de CO₂ en unas condiciones de temperatura y humedad controladas (incubadores IG650 de Jouan para el 7.5% de CO₂ y Steri-Cult 3310 de Thermo Scientific para el 5% de CO₂). Para la conservación a largo plazo, las líneas celulares fueron congeladas en las condiciones indicadas por el proveedor y almacenadas en depósitos de nitrógeno líquido (MVE Cryo System 4000 de Cryo Solutions y LS3000 de Taylor-Wharton Laboratory Systems). Tanto la cabina, como los incubadores y uno de los depósitos de nitrógeno líquido mencionados se muestran en la figura 3.1.



Figura 3.1. Cabina Cytostar de flujo laminar vertical de seguridad biológica y química de clase II de Telstar (panel izquierdo). Incubadores de CO₂ IG650 de Jouan y Steri-Cult 3310 de Thermo Scientific (panel central). Depósito de nitrógeno líquido MVE Cryo System 4000 de Cryo Solutions LS3000 (panel derecho).

Antes de empezar a trabajar con cada una de las líneas celulares se realizaron **curvas de crecimiento** para establecer la relación existente entre el número de células sembradas por unidad de superficie y la duración de cada una de las fases de crecimiento. En estas curvas de crecimiento generalmente se pueden distinguir tres fases (Figura 3.2):

Fase lag: fase en la que no hay crecimiento o hay un crecimiento lento en la que las células se están recuperando del estrés del subcultivo, reconstruyen su citoesqueleto y segregan matriz extracelular para adherirse al sustrato antes de entrar de nuevo en el ciclo celular.

Fase log o exponencial: fase en la que el cultivo crece de forma exponencial y la población celular muestra un tiempo de duplicación definido conocido como *doubling time* que es

característico de cada línea celular. Esta fase se extiende hasta que las células llegan a la confluencia, es decir, cubren toda la superficie de cultivo en el caso de células adherentes.

Fase estacionaria o de *plateau*: fase en la que la velocidad de crecimiento se enlentece hasta detenerse debido a la falta de espacio, de factores de crecimiento y de nutrientes. En esta fase algunas líneas celulares se diferencian y otras simplemente salen del ciclo celular y permanecen viables en un estadio G_0 . Si no se reemplaza el medio de cultivo y se subcultivan las células, éstas acaban perdiendo la viabilidad y el número de células del cultivo comienza a disminuir. En este caso se produciría una cuarta fase denominada fase de declive.

Para asegurar la viabilidad, la estabilidad genética y la estabilidad fenotípica de las líneas celulares, éstas deben mantenerse en fase exponencial, por ello las células se subcultivaron de forma regular antes de que la monocapa alcanzara el 100% de confluencia. Además, en todos los casos se emplearon células con menos de 15 subcultivos desde su descongelación para garantizar la preservación de las características de la línea celular original. Por el mismo motivo, todos los experimentos se realizaron sobre células creciendo en fase exponencial.

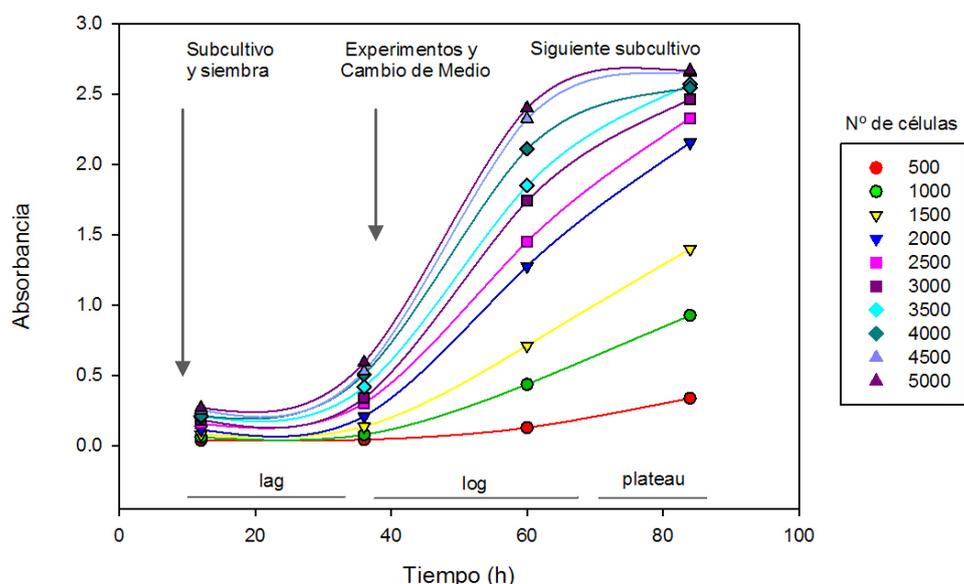


Figura 3.2. Curvas de crecimiento obtenidas a partir de la línea celular B16-F10 indicando las distintas fases.

3.1.1.1. Líneas celulares continuas

Para la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron diversas líneas celulares continuas de melanoma humano (SK-MEL-28, G-361, A375, 501 Mel e IGR-39) y de ratón (B16-F10 y B16-F10-luc2), así como una línea celular de melanocitos normales humanos (HEM). También se utilizaron determinadas líneas celulares de adenocarcinoma humano de mama (MCF7) y de colon (CACO-2). La mayor parte de las líneas celulares utilizadas fueron suministradas por la SCT de la Universidad de Murcia y procedían de la Colección Americana de Cultivo de Tejidos Tipo (ATCC) en el caso de las líneas celulares SK-MEL-28, G-361, B16-F10, 501 Mel y MCF7; y de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) en el caso de las líneas A375 y CACO-2.

La línea B16-F10-luc2 fue suministrada directamente por la empresa Caliper Life Sciences. y la línea IGR-39 fue obtenida directamente de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (GCMCC).

A continuación, se describen las características más relevantes de cada una de las líneas celulares continuas utilizadas, así como el protocolo para su mantenimiento, subcultivo y criopreservación:

SK-MEL-28

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Piel; melanoma maligno.

EDAD: 51 años. **SEXO:** Masculino.

MORFOLOGÍA: Poligonal. **TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 40 horas.

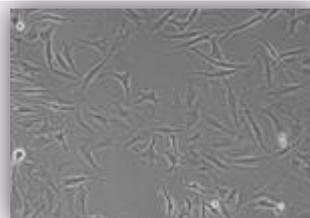
MEDIO DE CULTIVO: Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) + Glutamina 2 mM + 1% Aminoácidos no esenciales + Piruvato 1 mM + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: 5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inóculo recomendado es $1-2 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 80-90% de confluencia.



A375

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Piel; melanoma maligno.

EDAD: 54 años. **SEXO:** Femenino.

MORFOLOGÍA: Epitelial. **TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 18 horas.

MEDIO DE CULTIVO: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

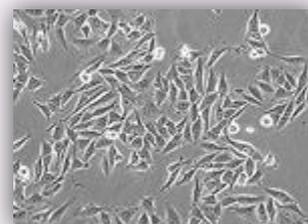
(Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 15 % SBF.

ATMÓSFERA: 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inóculo recomendado es $1-3 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 70-80% de confluencia.

**G-361**

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Piel; melanoma maligno.

EDAD: 31 años. **SEXO:** Masculino.

MORFOLOGÍA: Epitelial. **TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 50 horas.

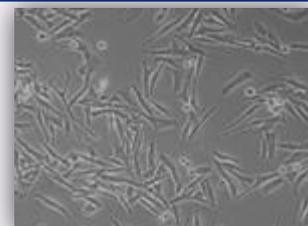
MEDIO DE CULTIVO: Medio McCoy 5A + Glutamina 2 mM + 10% SBF.

ATMÓSFERA: 5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.25 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inóculo recomendado es $2-3 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 80-90% de confluencia.



501 Mel

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: melanoma metastásico.

MORFOLOGÍA: TIPO DE CRECIMIENTO: Adherente.

MEDIO DE CULTIVO: RPMI 1640 (Glucosa 4.5 g/L) +

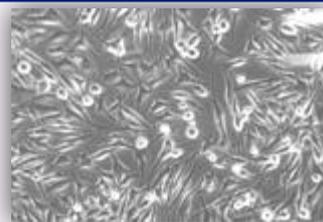
Glutamina 2 mM + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo.
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días.



IQR-39

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Piel; melanoma maligno.

EDAD: 26 años. **SEXO:** Masculino.

MORFOLOGÍA: TIPO DE CRECIMIENTO: Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 30 horas.

MEDIO DE CULTIVO: Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)

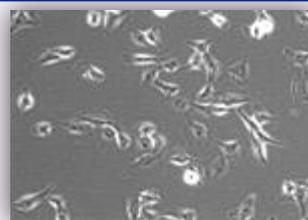
(Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 15% SBF.

ATMÓSFERA: 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

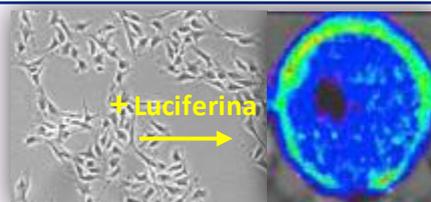
PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inoculo recomendado es $2-3 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 70-80% de confluencia.

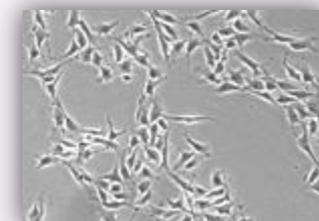


B16-F10-luc2**ORGANISMO:** *Mus musculus* (Ratón).**CEPA:** C57BL/6J.**ORÍGEN:** Piel; melanoma.

CARACTERÍSTICAS ESPECIALES: Se trata de una línea celular bioluminiscente establecida a partir de células B16-F10 transfectadas con el vector lentiviral pGL4 luc2 que codifica para el gen de la luciferasa de luciérnaga. Cuando estas células se exponen al sustrato (luciferina) emiten luz a una tasa aproximada de 450 fotones/seg/célula que puede ser visualizada utilizando el equipo *In Vivo Imaging System* (IVIS) de Caliper Life Sciences.

MORFOLOGÍA: Mezcla de células con morfología fusiforme y epitelial.**TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.**TIEMPO DE DUPLICACIÓN:** 16 horas.**MEDIO DE CULTIVO:** RPMI 1640 (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + Piruvato 1 mM + HEPES 10 mM + 10 % SBF. No utilizar antibióticos.**ATMÓSFERA:** 5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.**CRIOCONSERVACIÓN:** Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.**PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:** Idéntico al indicado para la línea B16-F10.**B16-F10****ORGANISMO:** *Mus musculus* (Ratón). **CEPA:** C57BL/6J.**ORÍGEN:** Piel; melanoma.**MORFOLOGÍA:** Mezcla de células con morfología fusiforme y epitelial.**TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.**TIEMPO DE DUPLICACIÓN:** 14 horas.**MEDIO DE CULTIVO:** Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 10 % SBF.**ATMÓSFERA:** 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.**CRIOCONSERVACIÓN:** Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.**PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:**

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.53 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inoculo recomendado es $1-2 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 80-90% de confluencia. No dejar en ningún caso que alcancen el 100% de confluencia.



MCF7

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: glándula mamaria; derivan de una metástasis pleural de un adenocarcinoma de mama.

EDAD: 69 años. **SEXO:** Femenino.

MORFOLOGÍA: Epitelial. **TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 52 horas.

MEDIO DE CULTIVO: Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) + Glutamina 2 mM + 1% Aminoácidos no esenciales + Piruvato 1 mM + Insulina 0.01mg/mL + 10 % SBF.

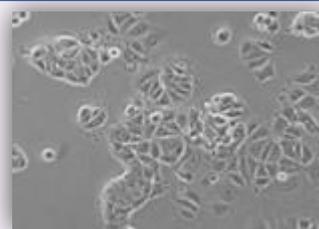
ATMÓSFERA: 5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

Al inicio puede haber células en suspensión. Se recomienda transferirlas durante los dos primeros subcultivos como se describe a continuación, pero no es necesario transferirlas en los siguientes subcultivos.

1. Retirar el medio de cultivo y pasarlo a un tubo de centrifuga.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.25 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar al tubo con el medio y las células del paso 1.
5. Centrifugar a 125xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inóculo recomendado es $2-4 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 70-80% de confluencia.



Caco-2

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Colon; adenocarcinoma colorrectal.

EDAD: 72 años. **SEXO:** Masculino.

MORFOLOGÍA: Epitelial. **TIPO DE CRECIMIENTO:** Adherente.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN: 40 horas.

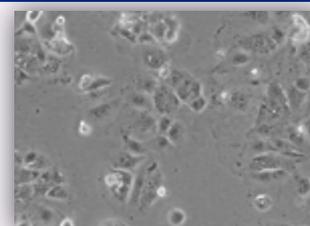
MEDIO DE CULTIVO: Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM) + Glutamina 2 mM + 1% Aminoácidos no esenciales + Piruvato 1 mM + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: 5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 10% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.25 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo. El inóculo recomendado es $2-4 \times 10^4$ células/cm².
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días. Volver a subcultivar las células cuando estén aproximadamente al 80-90% de confluencia.



3.1.1.2. Líneas celulares con bajo número de pases

El término líneas celulares con bajo número de pases hace referencia a aquellas líneas celulares que no han estado sometidas a crecimiento exponencial durante mucho tiempo, por lo que todavía guardan un alto grado de similitud con el tejido original. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron dos líneas celulares de melanoma de este tipo:

LAU-T1397A

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Metástasis en ganglio linfático de melanoma cutáneo.

EDAD: SEXO: Masculino

CARACTERÍSTICAS ESPECIALES: Estas células proceden de pacientes que desarrollaron resistencia frente a inhibidores de BRAF y de MEK debido a que presentan la mutación V600E en BRAF y la mutación P124S en MEK1/2. Ésta línea celular es silvestre para NRAS.

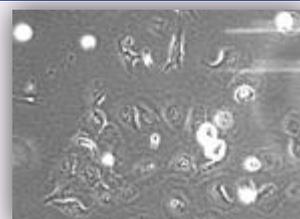
TIPO DE CRECIMIENTO: Semi-suspensión.

MEDIO DE CULTIVO: RPMI 1640 (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO: Idéntico al descrito para LAU-Me235



LAU-Me235

ORGANISMO: *Homo sapiens* (Humano).

ORÍGEN: Metástasis en ganglio linfático de melanoma cutáneo.

CARACTERÍSTICAS ESPECIALES: Estas células proceden de pacientes que desarrollaron resistencia frente a inhibidores de BRAF y de MEK debido a que presentan la mutación K601E en BRAF y la mutación E207K en MEK1/2. Ésta línea celular es silvestre para NRAS.

TIPO DE CRECIMIENTO: Adherente.

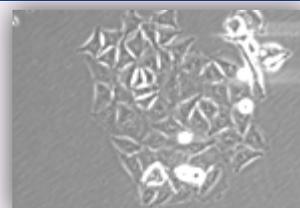
MEDIO DE CULTIVO: RPMI 1640 (Glucosa 4.5 g/L) + Glutamina 2 mM + 10 % SBF.

ATMÓSFERA: 7.5% CO₂, 95% Humedad. **TEMPERATURA:** 37°C.

CRIOCONSERVACIÓN: Almacenamiento en medio de cultivo completo + 10% adicional de SBF + 5% DMSO (v/v) en depósito de nitrógeno líquido en fase de vapor.

PROTOCOLO DE SUBCULTIVO:

1. Retirar y descartar el medio de cultivo.
2. Lavar la capa de células con una disolución de Tripsina 0.25% (p/v)-EDTA 0.25 mM para eliminar los restos de suero que contiene inhibidor de tripsina.
3. Añadir 2.0 mL de la disolución de Tripsina-EDTA. Incubar a 37°C para facilitar su dispersión (3-5 minutos) y observar las células en el microscopio invertido hasta que se disperse la capa de células.
4. Añadir 8.0 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina, agitar las células con suaves pipeteos y pasar a un tubo.
5. Centrifugar a 200xg durante 10 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender el pellet en el volumen apropiado de medio de cultivo.
6. Contar las células y añadir las alícuotas apropiadas de la suspensión celular a nuevos frascos de cultivo.
7. Incubar las células a 37°C y renovar el medio cada 2 o 3 días.



3.1.1.3. Cultivos primarios

El término cultivos primarios hace referencia a aquellos cultivos celulares iniciados directamente a partir de células, tejidos u órganos obtenidos directamente de un organismo. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se establecieron cultivos celulares primarios a partir de melanomas inoculados en ratón y a partir de metástasis de melanoma humano.

Cultivos establecidos a partir de melanomas inoculados en ratón

Para el establecimiento de cultivos primarios de melanoma de ratón previamente se inocularon los tumores en ratones de la cepa C57BL/6J. Todos los procedimientos llevados a cabo con animales fueron previamente aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Murcia y por la Dirección General de Ganadería y Pesca de la Comunidad Autónoma de Murcia (Referencia A1311121507). Los tumores se inocularon mediante la inyección subcutánea de 5×10^5 células B16-F10-*luc2* por ratón en una cohorte formada por 14 ratones C57BL/6J. Estos ratones constituyen un modelo singénico, puesto que las células B16-F10 fueron aisladas a partir de un melanoma de un ratón de esta misma cepa, por lo que no hay rechazo a pesar de que estos ratones presentan el sistema inmune intacto. Las células B16-F10-*luc2* expresan el gen de la luciferasa de luciérnaga por lo que, al ser expuestas al sustrato (luciferina), emiten luz a una tasa aproximada de 450 fotones/segundo/célula que puede ser visualizada utilizando el equipo *In Vivo Imaging System* (IVIS) de Caliper Life Sciences.

Una vez inoculados los tumores, los ratones se dividieron en 2 grupos de 7 ratones cada uno. Uno de esos grupos fue tratado con vehículo (DMSO) y el otro con la combinación MTX/TMECG (1mg/Kg/día y 50 mg/Kg/día, respectivamente) durante 21 días en los que la evolución de los tumores fue monitorizada *in vivo* mediante el equipo (IVIS). Pasado este tiempo, los tumores fueron extirpados en bloque incluyendo el tejido subcutáneo y la piel adyacentes. Los tumores se lavaron dos veces en PBS conteniendo Fungizona (5 µg/mL), Penicilina (200 U/mL) y Estreptomicina (200 µg/mL), y se cortaron en fracciones de 3-5 mm³. Estos fragmentos tumorales fueron entonces disgregados mecánicamente mediante tamizado. Para ello, se fueron colocando los fragmentos tumorales sobre un tamiz de nylon de 100 µm de diámetro de poro (Becton Dickinson) acoplado a un tubo de centrifuga de 50 mL y se fueron añadiendo gotas de RPMI suplementado con SBF al 10% a la vez que se iba presionando con el émbolo de una jeringa.

Se disgregaron y se recogieron en un tubo las células de todos los tumores procedentes de ratones control y, en otro tubo, las procedentes de todos los tumores procedentes de ratones tratados con MTX/TMECG para que sendas suspensiones celulares fueran un promedio de los tumores de los 7 ratones de cada grupo. La suspensión obtenida fue centrifugada a 200xg durante 10 minutos y el pellet resultante se resuspendió en 10 mL de medio de cultivo. Se realizó un recuento del número de células viables en la suspensión celular utilizando azul tripán en el contador automático TC10 (Bio-Rad Laboratories) y se sembró la cantidad adecuada de células en frascos de cultivo (para el establecimiento y mantenimiento de los cultivos primarios) y en placas de 6 pocillos (para la realización de los experimentos). Tanto las células en los frascos de cultivo como las células en las placas de ensayo se mantuvieron durante 72 h en RPMI 1640 (Glucosa 4.5 g/L) suplementado con Glutamina 2 mM, Piruvato 1 mM, HEPES 10 mM y 10 % SBF conteniendo Fungizona (2.5 µg/mL), Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL). Pasado este tiempo los agentes antimicrobianos se retiraron del medio de cultivo y tanto el mantenimiento posterior como los experimentos se llevaron a cabo en ausencia de agentes antimicrobianos.

Cultivos primarios obtenidos a partir de metástasis humanas

Las muestras tumorales fueron extraídas a partir de metástasis de pacientes con melanoma atendidos en el Hospital Universitario de Oxford, previo consentimiento informado. El protocolo fue evaluado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Oxfordshire (Referencia 09/H0606/5).

Las biopsias de metástasis de melanoma humano fueron fragmentadas utilizando un cortador giratorio y sometidas a disgregación enzimática con Dispasa II y Colagenasa P (3 mg/mL de cada una; Roche Diagnostics) en medio RPMI conteniendo 10% de SBF durante 1 h a 37°C. A continuación, las células fueron tamizadas a través de un tamiz de nylon de 100 µm de diámetro de poro (Becton Dickinson) acoplado a un tubo de centrifuga de 50 mL y se fueron añadiendo gotas de RPMI suplementado con SBF 10% a la vez que se iba presionando con el émbolo de una jeringa.

La suspensión celular se centrifugó a 200xg, se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS. Este procedimiento se repitió hasta que el sobrenadante adquirió un aspecto claro. Se realizó un recuento celular y se sembró la cantidad apropiada de células para la realización de los experimentos.

Para poder distinguir entre las células de melanoma y otros tipos de células presentes en los tumores disgregados se recurrió a la infección de los cultivos con un vector lentiviral portador del gen de la proteína mCherry bajo el control del promotor de la dopacromo tautomerasa (DCT). La DCT es una enzima implicada en la ruta de síntesis de melanina que se expresa exclusivamente en el linaje melanocítico por lo que, mediante este sistema, se consiguió expresar la proteína mCherry solamente en las células de melanoma y, con ello, marcarlas con fluorescencia roja para diferenciarlas de otros tipos celulares presentes en el tumor.

3.1.2. MODELOS ANIMALES

El animal de laboratorio es una de las piezas fundamentales en la investigación biomédica. Constituye un modelo para investigar y comprender las causas de las enfermedades que afectan al ser humano, así como para el desarrollo de importantes avances en el diagnóstico y tratamiento de las mismas. Estos animales son para el investigador un **reactivo biológico**, por lo que su pureza debe ser vigilada, controlada y contrastada, al igual que cualquier reactivo, sin descuidar su posible contaminación biótica o abiótica. Por esta razón, se requiere la producción de animales “estandarizados o definidos” con características genéticas y sanitarias definidas, criados en ambientes controlados que respeten los requerimientos de la especie, con el correcto cumplimiento de los principios éticos y de bienestar animal.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, los ensayos de experimentación animal se llevaron a cabo en la Sección de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia cumpliendo con las directrices legales establecidas por la Directiva Europea 86/609/CEE de 24 de noviembre respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos; así como con lo establecido por las directrices legales que regulan la experimentación con animales en España: el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre y la Ley 32/2007 de 7 de noviembre. El primero establece las normas aplicables para la protección de los animales de laboratorio utilizados en experimentación y otros fines científicos (incluyendo la docencia) y su finalidad es asegurar que a los animales utilizados se les concedan los cuidados adecuados, que no se les cause innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados y que el número de animales utilizados se reduzca al

mínimo aplicando, en lo posible, métodos alternativos de acuerdo con el Principio de las Tres Erres de Russell y Burch (Reducir, Refinar y Reemplazar). La Ley 32/2007, por su parte, establece las normas básicas sobre explotación, transporte, experimentación y sacrificio de los animales; así como un régimen común de infracciones y sanciones para garantizar su cumplimiento.

3.1.2.1. Ratones C57BL/6J

La cepa C57BL/6J es la cepa de ratón consanguínea más utilizada en investigación tanto como modelo de enfermedad como para la generación de ratones modificados genéticamente (Figura 3.3). Se utiliza en una amplia variedad de áreas de investigación incluyendo biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, genética, inmunología, neurobiología y oncología, entre otras. En general, los ratones C57BL/6J se reproducen bien, tienen una supervivencia larga y una baja susceptibilidad a los tumores. Sus células madre hematopoyéticas muestran un retraso considerable en la senescencia en comparación con otras cepas de ratones de laboratorio como BALB/c y DBA/2J y este rasgo tiene carácter dominante. Entre otras características estos ratones muestran una alta susceptibilidad a la obesidad, a la diabetes tipo II y a la aterosclerosis inducidas por la dieta, una alta incidencia de microftalmia y otras anormalidades oculares, una resistencia a las convulsiones epilépticas, una baja densidad ósea, una alta incidencia de hidrocefalia (1-4%), una pérdida de pelo asociada con la edad, una pérdida de audición de aparición tardía y una susceptibilidad a la adicción a la morfina, así como una preferencia por el alcohol superiores a la media.



Figura 3.3. Ejemplar de ratón de la cepa C57BL/6J.

Durante este trabajo se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6J para evaluar la efectividad *in vivo* de dos terapias combinadas contra el melanoma en la reducción de la masa de tumor primario y de las metástasis hepáticas. En concreto, se evaluó la efectividad de la terapia con MTX y TMECG, y la terapia con MTX y UCN-01 sobre tumores generados mediante la inyección subcutánea o intraesplénica de células B16-F10 o B16-F10-luc2 que son singénicas con la cepa C57BL/6J, por lo que no hay rechazo a pesar de que estos ratones mantienen el sistema inmune intacto.

Procedimiento:

En el **modelo de melanoma subcutáneo**, se inyectaron 5×10^5 células B16-F10 en el flanco dorsal de hembras de ratón C57BL/6J. Ocho días después de la inyección, se excluyeron los animales cuyos tumores superaban los 8 mm de diámetro y aquellos ratones sin tumor visible, se generaron grupos de 10 ratones y se iniciaron los distintos tratamientos. Para el estudio de la terapia MTX/TMECG, los ratones se trataron con 0.1 mg de MTX /Kg/día y/o 10 mg de TMECG /Kg/día. En el caso de la terapia MTX/UCN-01, los ratones se trataron con 1 mg de MTX /Kg/día y 0.1 mg de UCN-01/Kg/día. En ambos casos la administración se realizó mediante inyección intradérmica 5 veces a la semana

durante 3 semanas y se establecieron ratones control a los que se inyectó la misma cantidad de vehículo (DMSO). El área tumoral se midió periódicamente durante todo el tratamiento.

En el **modelo de metástasis hepáticas de melanoma**, se realizó una inyección intraesplénica de 5×10^5 células B16-F10-luc2 (Caliper Life Sciences). Para el estudio de la terapia MTX/TMECG, los ratones se trataron con 1 mg de MTX/Kg/día y con 10 o 50 mg de TMECG/Kg/día. Para el estudio de la terapia MTX/UCN-01 los ratones se trataron con 1 mg de MTX/Kg/día y 0.5 mg de UCN-01/Kg/día. En ambos casos la administración se realizó mediante inyección intraperitoneal desde el día 1 al día 14 y se establecieron controles a los que se inyectó la misma cantidad de vehículo (DMSO). Los tumores primarios y las metástasis hepáticas se analizaron a los 12 y a los 14 días post inyección, respectivamente, utilizando el equipo In Vivo Imaging System de Caliper Life Sciences. Finalmente, se realizó un estudio histológico *post mortem* tanto de los bazo como de los hígados. Para ello, ambos órganos se fijaron con formaldehído al 10% y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de 4 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su estudio microscópico. Para el análisis de la expresión de la enzima tirosinasa se cortaron secciones de 0.2 g a partir de los hígados de 3 ratones de cada tratamiento. Se extrajo el ARN total de 5 secciones de cada hígado con fenol-cloroformo y se emplearon 5 μg de ARN para sintetizar ADNc. Se combinó la misma cantidad de ADNc de estas 5 secciones de cada ratón y se empleó para la determinación de los niveles de ARNm de tirosinasa mediante RT-qPCR. Finalmente, se calculó la media del nivel de expresión de tirosinasa en los 3 ratones de cada tratamiento.

3.1.3. MODELOS DE PIEL HUMANA

Los modelos tridimensionales de piel hacen posible el crecimiento *in vitro* de un equivalente de la piel, con una dermis y una epidermis totalmente desarrolladas. Para su desarrollo, durante las primeras semanas de cultivo, se establecen los fibroblastos de manera firme dentro del sistema de soporte del cultivo. A medida que empiezan a crecer y multiplicarse, comienzan a producir los componentes extracelulares esenciales necesarios para conformar una dermis totalmente funcional. Posteriormente, se siembran en la superficie de la dermis las células epidérmicas, los queratinocitos. Durante las semanas siguientes, los queratinocitos crecen y conforman una epidermis estratificada. Al cabo de varias semanas se establece *in vitro* un equivalente de la piel completamente desarrollado, con una dermis y epidermis viables, con la misma estructura básica y funciones que la piel *in vivo*.

3.1.3.1. Modelo de piel de melanoma humano

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizó el modelo de piel MLNM-FT-A375 (Mat Tek Corporation), que constituye un modelo de melanoma humano. El modelo está constituido por células de melanoma humano A375, queratinocitos humanos normales de la epidermis (NHEK) y fibroblastos humanos normales de la dermis (NHDF), que se cultivan para dar lugar a una epidermis con múltiples capas, altamente diferenciada y con células de melanoma en varios estados de malignidad. En las diferentes fases de crecimiento del cultivo, el tejido muestra una fase de crecimiento radial (RGP), una fase de crecimiento vertical (VGP) o un fenotipo de melanoma metastásico (Figura 3.4). Las células se cultivan en unos insertos utilizando medio libre de suero y son capaces de alcanzar elevados niveles de diferenciación. El modelo MLNM-FT-A375 presenta unas características de morfología y crecimiento similares a las observadas *in vivo* que son uniformes y altamente reproducibles. La epidermis de este modelo de piel consiste en capas organizadas de

células basales, espinosas, granulares y corneas; y la dermis está compuesta por una matriz de colágeno que contiene fibroblastos humanos normales. Estructuralmente, este modelo reproduce la progresión *in vivo* del melanoma, por lo que constituye una herramienta muy útil para el estudio del melanoma y para el desarrollo de estrategias terapéuticas y preventivas.

Los modelos de piel de melanoma MLNM-FT-A375 conteniendo células de melanoma A375 se crecieron en un sistema gas/líquido sumergidos en medio de cultivo MCDB153, el cual fue renovado cada dos días. Los compuestos MTX y TMECG se añadieron directamente en el medio de cultivo. El mantenimiento de los cultivos fue realizado en los laboratorios de Mat Tek Corporation. Una vez finalizado el experimento, los tejidos fueron fijados y embebidos en parafina. Se realizaron secciones de 5 μm , que fueron teñidas con hematoxilina y eosina y visualizadas al microscopio óptico para la adquisición de fotografías.

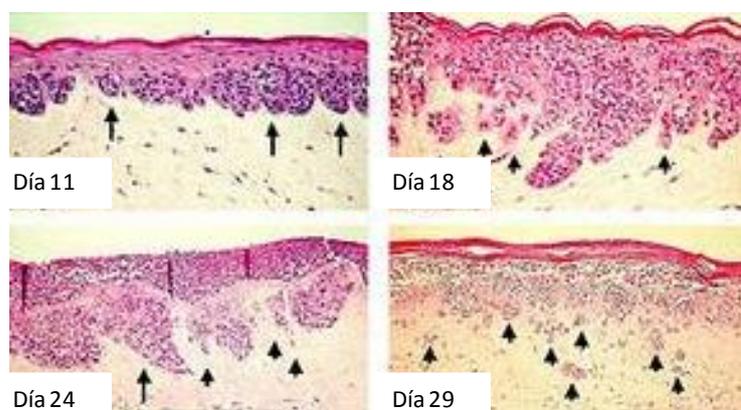


Figura 3.4. Evolución del modelo de melanoma en piel sintética MLNM-FT-A375.

3.2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

3.2.1. ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR

3.2.1.1. Ensayo con azul tripán

El azul tripán (diamina azul o azul Niágara) es un colorante azoico derivado de la toluidina utilizado para ensayos de viabilidad celular puesto que se trata de un colorante vital que permite diferenciar células vivas de células muertas. Con esta tinción, las células vivas no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla. De esta manera, el azul tripán no penetra en las células viables con la membrana intacta, mientras que este colorante si es capaz de atravesar la membrana de las células muertas. Por lo tanto, las células muertas se tiñen con un distintivo color azul, mientras que las células vivas aparecen refringentes y sin colorear bajo el microscopio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que este método no permite diferenciar entre células muertas por necrosis o por apoptosis. Debido a que las células vivas excluyen el colorante y no se tiñen, este método también se denomina método de tinción por exclusión.

El procedimiento general para realizar un recuento con azul tripán consiste en mezclar volúmenes iguales de la suspensión celular que se desea contar y de una disolución de azul tripán al 0.4%, aunque también se puede recurrir a otras diluciones de la suspensión celular siempre y cuando se tenga en cuenta el factor de dilución correspondiente en los cálculos finales. Una vez teñida con azul tripán, la suspensión celular se homogeniza y puede ser sometida a recuento. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, los recuentos se realizaron utilizando un hemocitómetro o cámara de Neubauer, o bien utilizando el contador de células automático TC10 de Bio-Rad Laboratories.

Hemocitómetro o Cámara de Neubauer

El hemocitómetro es un portaobjetos especializado en cuya parte central presenta una ligera depresión grabada con una retícula cuadrangular (Figura 3.5). Esta retícula tiene unas dimensiones de 3 mm x 3 mm y está dividida a su vez en 9 cuadros de 1 mm² (cuadro rojo) cada uno. Los cuatro cuadros localizados en las esquinas de esta cámara se dividen, a su vez, en 16 cuadros (cuadro azul) de 0.0625 mm². Sobre la parte central de la cámara se coloca un cubreobjetos de cristal de 22 mm x 22 mm y se introduce (por capilaridad y con ayuda de una pipeta) un volumen de la suspensión celular teñida con azul tripán entre el cubreobjetos y la cámara. Puesto que el espacio que queda entre el cubreobjetos y la cámara es de 0.1 mm de altura y las dimensiones de los cuadros grabados en la cámara también son conocidas, tanto el volumen de líquido contenido entre el hemocitómetro y el cubreobjetos, como el volumen en cada uno de los cuadros que componen la cuadrícula son conocidos. Esto permite el cálculo del número de células por unidad de volumen (concentración) de la suspensión celular de partida, teniendo en cuenta el factor de dilución con el azul tripán.

Para los ensayos de viabilidad realizados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se observó la cámara bajo el microscopio óptico y se realizó un recuento del número de células vivas (sin colorear y refringentes) y muertas (teñidas de azul) en cada uno de los cuatro cuadrados de 1 mm² localizados en las esquinas de la cámara y se realizó un promedio entre los cuatro cuadros.

El número de células viables, de células muertas y de células totales por mililitro de la suspensión celular de partida se calculó de la siguiente forma:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células viables/mL} = \text{Promedio de células viables por cuadro} \times 10\,000 \times \text{FD}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ células muertas/mL} = \text{Promedio de células muertas por cuadro} \times 10\,000 \times \text{FD}$$

$$\text{N}^{\circ} \text{ células totales/mL} = \text{Promedio de células totales por cuadro} \times 10\,000 \times \text{FD}$$

En las ecuaciones anteriores, el número promedio de células por cuadro se multiplica por 10 000 ya que el volumen correspondiente a la región contada en la cámara es de 0.1 mm^3 (1 mm de lado x 1 mm de lado x 0.1 mm de altura). De esta manera, para obtener el número de células contenidas en 1 mL a partir del número de células contenidas en 0.1 mm^3 (= $0.1 \mu\text{L}$) hay que multiplicar por 10 000. FD hace referencia al factor de dilución de la suspensión celular en azul tripán.

Para estimar el porcentaje de viabilidad celular se utilizó la siguiente ecuación:

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

La cámara de Neubauer permite una estimación de la viabilidad cuando la suspensión celular tiene una concentración de entre 2.5×10^5 y 2.5×10^6 células/mL, siendo la concentración óptima de 1×10^6 células/mL. Por debajo de 2.5×10^5 células/mL la cantidad de células no es suficiente para poder dar una estimación real de la concentración y, por encima de 2.5×10^6 células/mL el número de células es tan grande que la probabilidad de cometer errores de conteo es demasiado alta y conviene diluir más la muestra para acercar la concentración al rango óptimo.

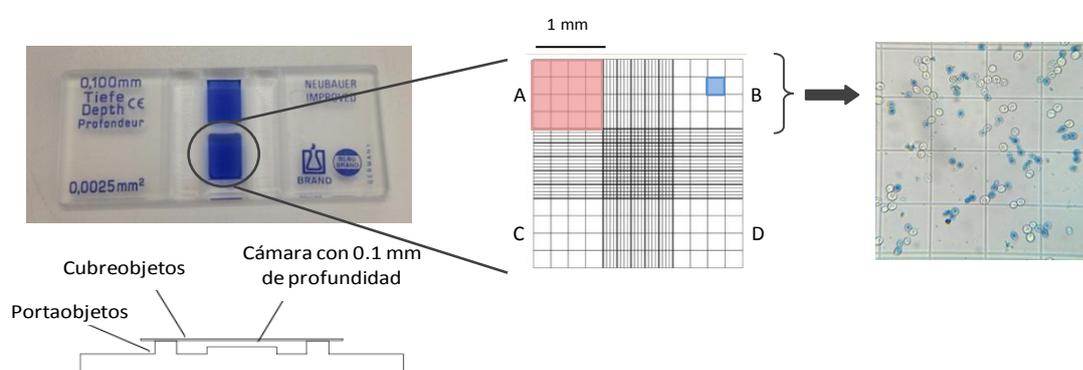


Figura 3.5. Imagen y esquema de la Cámara de Neubauer utilizada para realizar los recuentos celulares, mostrando los distintos cuadrantes de los que consta, así como una imagen al microscopio óptico de un recuento con azul tripán.

Contador de células automático TC10 de Bio-Rad

Para realizar un ensayo de viabilidad celular utilizando el contador de células automático TC10 se introducen $10 \mu\text{L}$ de la mezcla de suspensión celular y azul tripán en una cámara de plástico especial y ésta se inserta en el contador. El software del instrumento autoenfoca y realiza un recuento utilizando un análisis de múltiples planos focales para determinar la viabilidad celular con una elevada precisión.

El contador detecta automáticamente la presencia de azul tripán en la muestra y realiza los cálculos por defecto teniendo en cuenta una dilución 1/2 de la muestra en azul tripán. Si la dilución de la muestra es distinta se deben realizar los cálculos pertinentes para determinar la concentración real de la muestra, o bien cambiar los parámetros de dilución en el aparato antes del recuento. Este contador permite realizar recuentos de células con un diámetro comprendido entre 6 y 50 μm en un rango de concentración entre 5×10^4 y 1×10^7 células/mL.

Este contador proporciona un recuento de células totales y de células vivas por mililitro, así como el porcentaje de viabilidad celular. Además, proporciona una imagen a distintos aumentos de las células que han sido contadas y un histograma que indica la distribución de células vivas y muertas en función del tamaño.

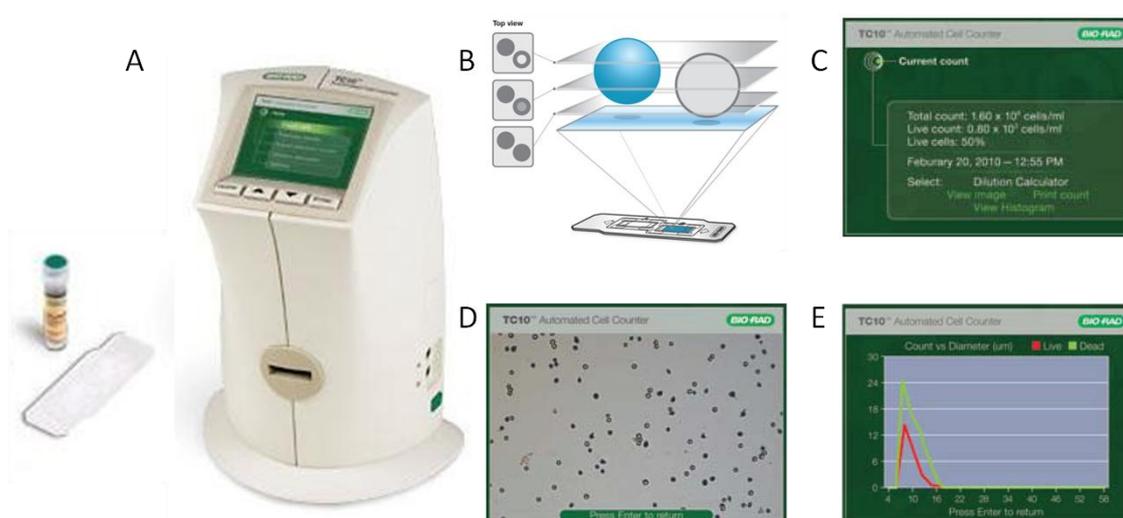


Figura 3.6. (A) Contador de células automático TC10 junto al reactivo azul tripán y un portaobjetos especializado de recuento. (B) Esquema del análisis de múltiples planos focales realizado por el contador TC10 durante el recuento. (C) Captura de pantalla de un recuento celular con azul tripán. (D) Captura de pantalla de la imagen de las células en la cámara proporcionada por el contador. (E) Captura de pantalla del histograma, proporcionado por el contador, indicando el número de células vivas (línea roja) y muertas (línea verde) frente a su diámetro en un recuento con azul tripán.

3.2.1.2. Ensayo con MTT

El ensayo con MTT es un método colorimétrico sensible y cuantitativo que permite medir la viabilidad y la proliferación celular. Se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células vivas para convertir un sustrato denominado bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT), de color amarillo y soluble en agua, en su forma formazano, de color azul-morado e insoluble en agua. Este producto forma cristales insolubles en agua que no pueden atravesar la membrana plasmática y quedan retenidos en el interior de las células. Para liberar este producto, es necesario solubilizar las células, utilizando disolventes orgánicos (DMSO, isopropanol-HCl o etanol), antes de realizar la colorimetría. La cantidad de formazano producida se puede medir por colorimetría y es directamente proporcional al número de células (en un rango de concentración). La capacidad de las células para reducir el MTT es un índice de la integridad y actividad de las mitocondrias, por lo que los resultados pueden ser interpretados como una medida de la viabilidad y/o número de células (Figura 3.7).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se realizaron ensayos con MTT para la elaboración de las curvas de crecimiento de cada una de las líneas celulares utilizadas. Para ello, se sembraron placas con cantidades crecientes de células y se cuantificó mediante MTT el aumento del número de células con el tiempo. El ensayo con MTT también se utilizó para la realización de ensayos de citotoxicidad. En estos ensayos se determinó la capacidad para reducir MTT a formazano de células sometidas a distintos tratamientos en comparación con células en una situación control.

Procedimiento:

Para la realización de los ensayos con MTT en placas de 96 pocillos se prepararon 5 mL de una disolución madre de MTT (5 mg/mL) en medio de cultivo sin rojo fenol y sin suplementos por cada placa incluida en el ensayo. Se filtró esta disolución a través de un filtro de 0.22 μm para esterilizarla y para eliminar los residuos insolubles. Esta disolución filtrada se puede guardar a 4°C y protegida de la luz durante aproximadamente un mes. A continuación, se retiró el medio de cultivo de la placa de 96 pocillos que contiene las células sometidas a las condiciones deseadas y se añadieron 200 μL /pocillo de medio fresco sin rojo fenol y 50 μL /pocillo de la disolución madre de MTT. Las placas se protegieron de la luz cubriéndolas con papel de aluminio, se agitaron orbitalmente y se incubaron a 37°C durante 2-4 horas (dependiendo de la línea celular). Pasado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo con MTT y se añadieron 100 μL de DMSO para solubilizar los cristales de formazano. Se agitó la placa durante 10 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm utilizando la absorbancia a 690 nm como referencia para el plástico de la placa. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral la medida de la absorbancia en los ensayos con MTT se realizó utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

3.2.1.3. Ensayo con XTT

Es un método colorimétrico similar al MTT que emplea una sal de tetrazolio distinta. Este ensayo se basa en la capacidad de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa de las células metabólicamente activas para convertir el 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2-H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT), de color amarillo, en un derivado formazano de color naranja que, en este caso, es soluble en agua. Aunque la biorreducción del XTT es menos eficaz que la del MTT, se consiguen resultados similares realizando el ensayo en presencia de menadiona (Vitamina K₃) que actúa sobre la cadena de transporte electrónico mitocondrial. La principal ventaja que presenta este método es que, dado que el producto final es soluble en agua, no es necesario utilizar agentes como el DMSO para romper las células y solubilizarlo, por lo que se pueden recuperar las células después del ensayo. Además el XTT es menos tóxico que el MTT. Éste ensayo permite valorar la proliferación celular y la citotoxicidad de compuestos en líneas celulares no adherentes, en las que no es posible realizar el ensayo MTT puesto que crecen en suspensión y no se puede retirar el medio de cultivo de la placa (Figura 3.7).

Procedimiento:

Para la realización de los ensayos con XTT en placas de 96 pocillos se prepararon 5 mL de una disolución madre de XTT (1 mg/mL) en medio de cultivo sin rojo fenol y sin suplementos y una disolución de menadiona (10 mM) en acetona. Para preparar la disolución de trabajo se añadieron 10 μL de esta disolución de menadiona por cada mL de disolución de XTT. Por cada placa de 96 pocillos se prepararon 5 mL de disolución de XTT/Menadiona.

Se añadieron 50 μL /pocillo de la disolución de XTT/Menadiona a cada pocillo de la placa que previamente contenía 200 μL de medio. La placa se agitó orbitalmente, se protegió de la luz con papel de aluminio y se incubó a 37°C durante 4 horas. Pasado el tiempo de incubación, se agitó la placa y se midió la absorbancia a 450 nm utilizando la absorbancia a 570 nm como referencia para el plástico de la placa. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, la medida de la absorbancia en los ensayos con MTT se realizó utilizando un lector de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech).

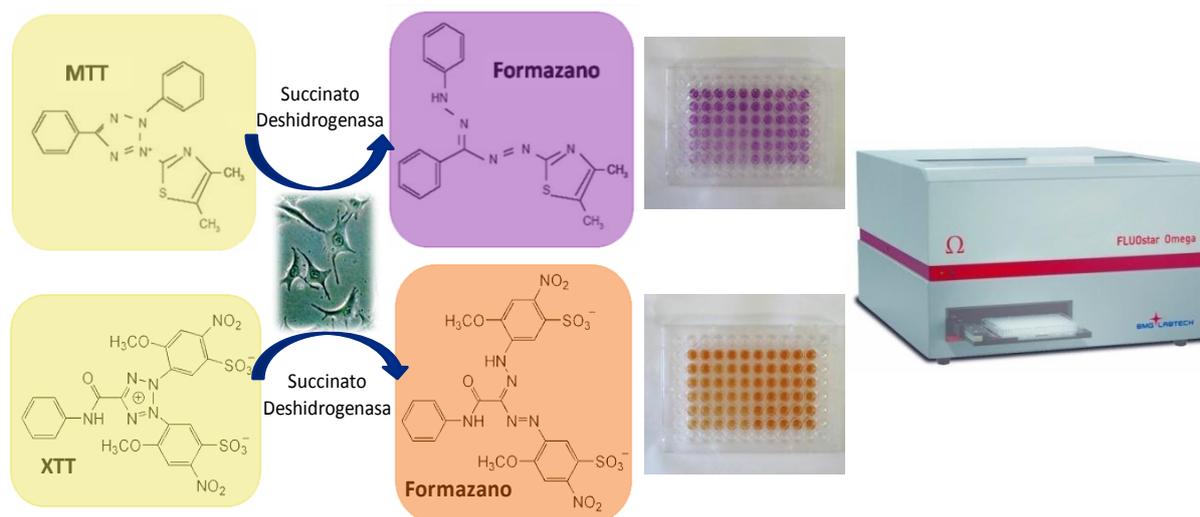


Figura 3.7. Esquema de los ensayos de viabilidad con MTT y con XTT, junto al lector de placas FLUOstar Omega.

3.2.2. ENSAYOS DE APOPTOSIS

3.2.2.1. Detección de apoptosis mediante ELISA

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células. Estos cambios incluyen la contracción de la célula, la aparición de una serie de protuberancias en la membrana plasmática (*blebbing*), la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear y la fragmentación del ADN. En concreto, la fragmentación del ADN se produce por la activación de una endonucleasa nuclear dependiente de Ca^{+2} y Mg^{+2} que rompe la doble hélice del ADN por la región de unión entre nucleosomas que es la región más frágil, generando mono- y oligonucleosomas. Por el contrario, el ADN de los nucleosomas que está estrechamente acompañado con el core de histonas H2A, H2B, H3 y H4, es menos accesible a la acción de las endonucleasas. Por tanto, los fragmentos de ADN producidos son múltiplos de 180 pares de bases (pb), que es la longitud de ADN que hay en una unidad nucleosomal. Cuando se extrae el ADN de células apoptóticas y se separa mediante electroforesis en gel de agarosa, estos mono- y oligonucleosomas producen un patrón típico en escalera.

El enriquecimiento en mono- y oligonucleosomas en el citoplasma de las células apoptóticas ocurre varias horas antes de la fragmentación celular por lo que se han desarrollado diversos métodos de detección de apoptosis mediante la cuantificación de la fragmentación del ADN. Estos métodos se basan en la detección de fragmentos de ADN de bajo peso molecular (LMW, acrónimo del inglés *low molecular weight*) que se incrementan durante la apoptosis, o de ADN de alto peso

molecular (HMW, acrónimo del inglés *high molecular weight*) que corresponde a ADN sin fragmentar que disminuye en las células apoptóticas.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizó el kit *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* (Roche Diagnostics) para la cuantificación relativa de la apoptosis inducida por diversos compuestos respecto a una situación control. Este kit se basa en la detección mediante ELISA de los fragmentos de ADN de tipo LMW acoplados con histonas (mono- y oligonucleosomas) que se liberan al citoplasma de las células apoptóticas, los cuales pueden ser separados de los HMW mediante centrifugación de los núcleos intactos de las células. Este ensayo utiliza un inmunoensayo tipo ELISA para la detección de estos fragmentos LMW. Para ello, las muestras se depositan en una microplaca especial cuyos pocillos van recubiertos de estreptavidina y, se añaden anticuerpos monoclonales anti-histona-biotina y anti-ADN-peroxidasa que se unirán respectivamente a las histonas y al ADN de los nucleosomas. Estos inmunocomplejos quedarán anclados al fondo del pocillo gracias a la fuerte afinidad de la estreptavidina por la biotina.

Puesto que el anti-ADN está conjugado con la enzima peroxidasa, la cantidad de esta enzima unida al inmunocomplejo es proporcional a la cantidad de mono- y oligonucleosomas presentes en la muestra y, por tanto, a la cantidad de células apoptóticas. La actuación de esta enzima sobre el sustrato 2-2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazol-sulfónico) (ABTS) da lugar a un producto de color verde, por lo que la actividad peroxidasa puede ser determinada espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 415 nm.

Procedimiento:

En primer lugar, se hicieron crecer las células en placas de 96 pocillos y se sometieron a las condiciones requeridas por el experimento. A continuación, en el caso de células adherentes, se retiró el sobrenadante, que contiene el ADN de las células necróticas. Si se desea evaluar la presencia de necrosis se puede guardar a 4°C este sobrenadante para analizarlo posteriormente. Si solo se desea evaluar apoptosis, se puede descartar dicho sobrenadante. Se añadieron 200 µL de tampón de lisis a cada pocillo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este tampón rompe la membrana plasmática pero deja intactos los núcleos, por lo que solo libera el ADN fragmentado presente en el citoplasma de las células apoptóticas, pero no el ADN nuclear de las células normales. Pasado este tiempo de incubación, se centrifugó la placa a 200xg durante 10 minutos para sedimentar los núcleos y se transfirieron 20 µL del sobrenadante de cada uno de los pocillos a evaluar a los pocillos de la placa de ELISA. Se añadió a cada pocillo 80 µL de tampón de incubación conteniendo anti-histona-biotina y anti-ADN-peroxidasa en las concentraciones indicadas por el fabricante. La placa se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Tras la incubación, se retiró el sobrenadante evitando tocar el fondo del pocillo y se lavaron los pocillos tres veces con 250 µL de tampón de incubación para retirar tanto los anticuerpos no unidos al complejo, como los restos del lisado celular. Se añadieron a cada pocillo 100 µL de disolución de ABTS (sustrato de la peroxidasa) y se midió la absorbancia a 415 nm en un lector de placas cada 5 minutos durante 40-45 minutos. Se representó gráficamente el incremento de absorbancia de cada muestra con el tiempo y se tomó la pendiente de la recta de ajuste de regresión lineal como parámetro para el cálculo del Factor de Enriquecimiento Citosólico Nucleosomal. Este factor se calculó dividiendo la pendiente de cada una de las muestras entre la pendiente del control y normalizando además estos valores con la cantidad de células inicial que se sometió a lisis (para lo cual se realizó en paralelo un

ensayo con MTT a pocillos que habian sido sometidos al mismo tratamiento que los pocillos que se tomaron para el ensayo de apoptosis).

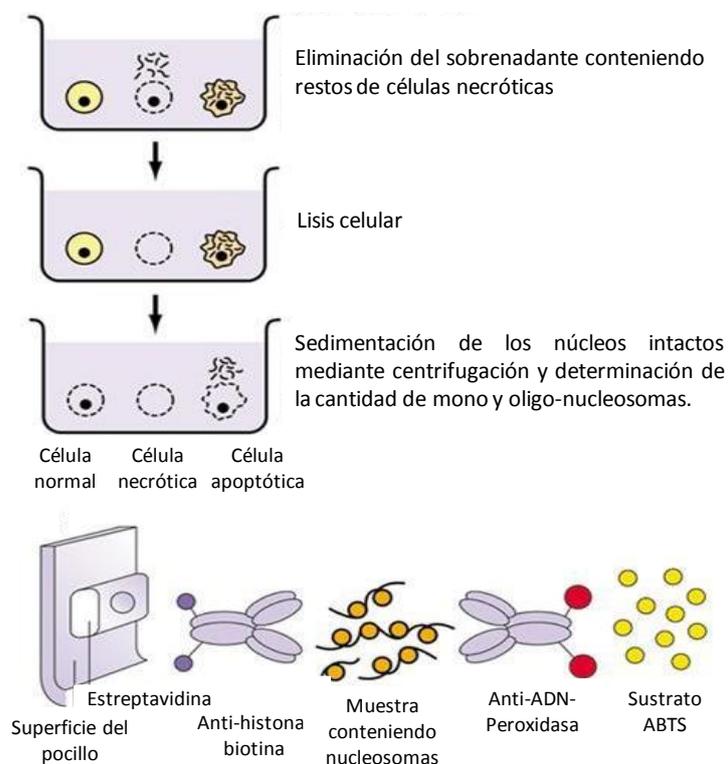


Figura 3.8. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis mediante ELISA de Roche.

3.2.2.2. Análisis de apoptosis mediante ensayo con Anexina V

En las etapas tempranas de la apoptosis ocurren cambios en la superficie celular. Una de estas alteraciones es la translocación de fosfatidilserina (PS) de la cara interna a la cara externa de la membrana plasmática, por lo que la PS queda expuesta en la superficie celular. La Anexina V es una proteína dependiente de Ca^{+2} que se une específicamente al fosfolípido PS, por lo que puede ser empleada para la determinación de la exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática y, por tanto, para detectar células en apoptosis.

Annexin-V-FLUOS Staining Kit (Roche Diagnostics) es un kit que se usa para la detección y cuantificación de la apoptosis y se basa en la unión específica de la Anexina V a la PS de la cara externa de la membrana plasmática. Este Kit utiliza Anexina V conjugada con Fluoresceína que se unirá a la superficie de las células apoptóticas. Para el análisis de las células necróticas se utiliza un colorante rojo fluorescente denominado yoduro de propidio, el cual puede atravesar la membrana de las células necróticas y de las células en apoptosis tardía e intercalarse en su ADN y ARN. El yoduro de propidio se une a los ácidos nucleicos con una relación de 1 molécula de colorante por cada 4 o 5 pares de bases y, una vez unido a los ácidos nucleicos, aumenta su fluorescencia entre 20 y 30 veces. Cuando el yoduro de propidio está unido a ácidos nucleicos, muestra unas longitudes de onda máximas de excitación y de emisión de 535 nm y 617 nm, respectivamente.

Con esta doble tinción, se pueden distinguir las poblaciones de células vivas (Anexina V -/Yoduro de propidio -) de la células en apoptosis temprana (Anexina V +/Yoduro de propidio -) y las necróticas o en apoptosis tardía (Anexina V +/Yoduro de propidio+) cuando se hacen pasar a través de un citómetro de flujo con el láser adecuado (Figura 3.9).

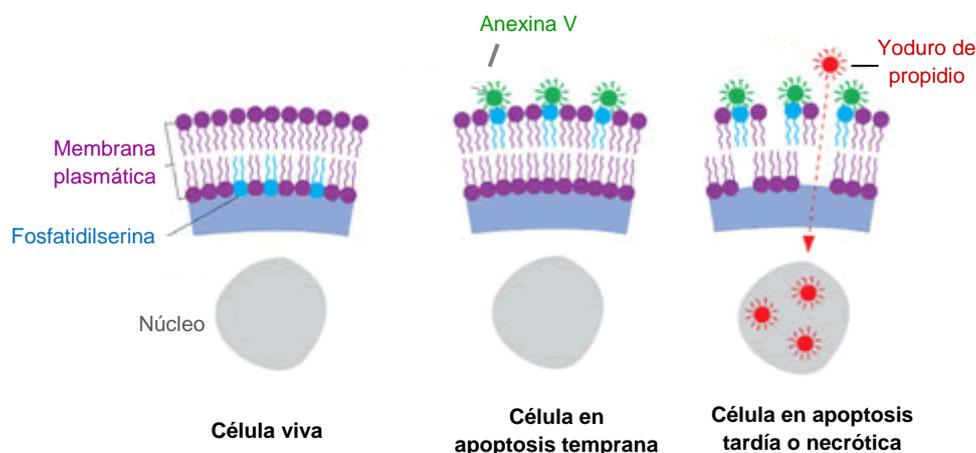


Figura 3.9. Esquema del funcionamiento del kit de detección de apoptosis *Annexin-V-FLUOS Staining Kit*.

Procedimiento:

En primer lugar, se preparó la disolución de tinte diluyendo 2 μL del agente de marcaje Annexin-V-FLUOS y 2 μL de yoduro de propidio en 100 μL de tampón de incubación por cada muestra de células. Se preparó una suspensión celular de 1×10^6 células y se lavaron con PBS. Se resuspendieron las células en 100 μL de la disolución de tinte y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente durante 20-30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 500 μL del tampón de incubación a cada muestra y se hicieron pasar las células a través del citómetro de flujo Coulter Epics XL (Beckman Coulter) con un láser de Argón de 488 nm. Los datos se analizaron con el programa Expo32 ADC.

3.2.2.3. Análisis de la apoptosis mediante tinción de Hoechst

Uno de los cambios más notables que ocurren durante el proceso de apoptosis es la condensación de la cromatina nuclear. El colorante Hoechst 33342 es un agente intercalante que se une al ADN de las células y emite fluorescencia azul, que será más intensa cuanto más condensada está la cromatina. Las longitudes de onda máximas de excitación y emisión de este colorante son 350 nm y 461 nm respectivamente, cuando se encuentra unido al ADN. Así, la observación del ADN mediante la tinción con Hoechst 33342 nos permite diferenciar las células apoptóticas (cromatina más brillante) de las células normales (cromatina menos brillante) utilizando un microscopio de fluorescencia.

Procedimiento:

Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se sometieron a los agentes que se deseaba testar a las concentraciones y tiempos pertinentes. Una vez transcurrido el tiempo de incubación necesario, se retiró el medio, se añadieron 2 mL/pocillo de medio fresco y 2 mL/pocillo de Fijador de Carnoy (metanol:ácido acético en proporción 3:1) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras este tiempo se retiró la mezcla, se volvieron a añadir 2 mL/pocillo de Fijador de Carnoy y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se retiró el fijador y se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Una vez seca, se adicionaron 2 mL de Hoechst 33342 (10 µg/mL) en PBS y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se retiró el colorante y se visualizaron las muestras en el microscopio invertido de fluorescencia tomando fotografías de cada muestra de varios campos a distintos aumentos.

3.2.3. ENSAYOS DE INVASIVIDAD

La característica distintiva de las células que constituyen los tumores malignos es su capacidad para invadir los tejidos adyacentes para diseminarse y dar lugar a focos metastásicos en otros lugares del organismo. La membrana basal de los epitelios y la matriz extracelular subyacente constituyen una barrera física y continua que normalmente bloquea el paso de células y macromoléculas. Sin embargo, las células tumorales más agresivas que integran los tumores malignos son capaces de degradar localmente esta barrera, lo que les permite invadir el tejido circundante y alcanzar los sistemas linfático y circulatorio para diseminarse a lugares distantes. Este potencial invasivo se debe a alteraciones en la adhesión celular, a la capacidad de degradación proteolítica de la matriz extracelular y a la movilidad de las células tumorales.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se realizaron ensayos de invasividad *in vitro* para determinar el efecto del tratamiento con MTX sobre la capacidad invasiva de células de melanoma control y sometidas a silenciamiento del factor de transcripción MTF. Para ello, se utilizaron las cámaras de invasión *BD BioCoat Matrigel* (BD Biosciences) que consisten en unas placas de cultivo cuyos pocillos presentan unos insertos que los dividen en una cámara superior y una inferior. Estos insertos presentan una membrana porosa de tereftalato de poliestireno (PET), con un diámetro de poro de 8 µm, recubierta de una fina capa de *Matrigel* que consiste en una mezcla gelatinosa de proteínas, proteoglicanos y factores de crecimiento que se asemeja a la matriz extracelular que constituye la membrana basal localizada en la base de los tejidos epiteliales. Esta capa de *Matrigel* ocluye los poros de la membrana de PET, de manera que bloquea la migración de las células no invasivas a través de la membrana. Sin embargo, las células invasivas son capaces de atravesar tanto la matriz de *Matrigel* como los poros de la membrana de PET para alcanzar la cámara inferior en la que se añade un quimioatrayente como el SBF (Figura 3.10). Esta membrana puede retirarse de los pocillos para ser teñida y procesada para su análisis microscópico.

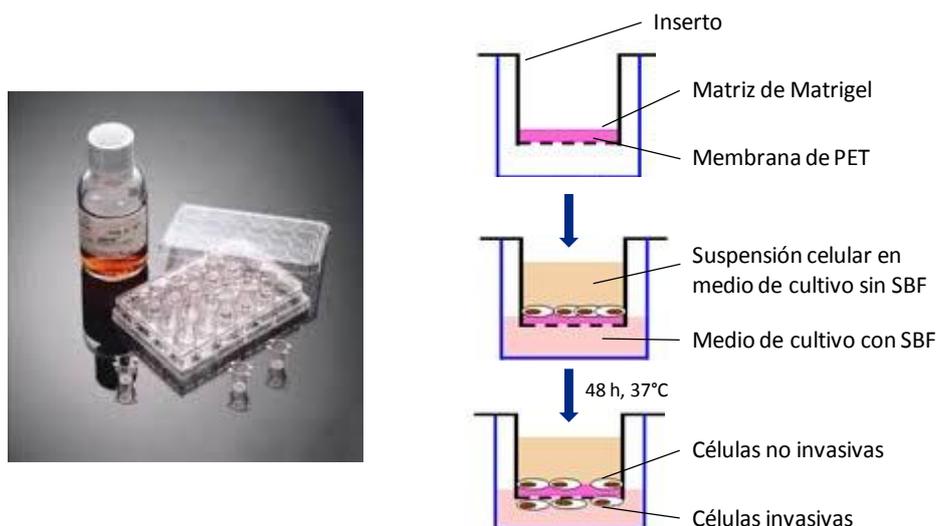


Figura 3.10. Placas *BD BioCoat Matrigel* (panel izquierdo) y esquema de las fases del ensayo de invasividad (panel derecho).

Procedimiento:

En primer lugar, se añadieron 0.5 mL de medio de cultivo sin suero por pocillo en placas de 24 pocillos, se colocaron los insertos que contienen las membranas y se añadieron otros 0.5 mL de medio en la parte superior del inserto. Las cámaras se incubaron durante 2 horas a 37°C para permitir la rehidratación de la matriz de *Matrigel*. Mientras tanto, se preparó una suspensión celular conteniendo 5×10^4 células/mL a partir de cultivos de células SK-MEL-28 e IGR-39 control y sometidas a tratamiento con MTX (1 μ M) durante 48 y 72 horas, respectivamente; así como de cultivos de células SK-MEL-28 sometidas a silenciamiento de MITF y tratamiento con MTX (1 μ M) durante 48 horas. Tras la rehidratación de las membranas de *Matrigel*, se retiró el medio de cultivo del interior del inserto y los insertos se transfirieron a nuevos pocillos con 0.5 mL de medio de cultivo conteniendo un 5% de SBF como quimioatrayente. Seguidamente, se adicionaron 0.5 mL de la suspensión celular correspondiente sobre cada inserto y las cámaras se incubaron durante 48 horas a 37°C para permitir la migración de las células. Dado que todas las suspensiones celulares se prepararon a una concentración de 5×10^4 células/mL, el número de células sembrado en el caso de las células control y en el caso de células sometidas a los distintos tratamientos fue el mismo. Tras este tiempo de incubación, se retiraron las células no invasivas de la parte superior del inserto. Para ello, se frotó la superficie de la membrana en primer lugar con un hisopo con punta de algodón seco y, en segundo lugar, con hisopo humedecido en medio de cultivo. A continuación, se tiñeron las células de la superficie inferior de la membrana con Cristal Violeta y se separó la membrana del resto del inserto con un bisturí.

Por último, la membrana se colocó con las células hacia abajo sobre un portaobjetos conteniendo una pequeña gota de aceite de inmersión, se colocó una nueva gota de aceite de inmersión sobre la membrana y sobre ella se colocó un cubreobjetos de vidrio. Las preparaciones se observaron al microscopio y se tomaron fotografías de varios campos. La cuantificación de las células se realizó midiendo la superficie ocupada por las células teñidas utilizando el complemento de recuento del programa *Image J*.

3.2.4. MICROSCOPIA

3.2.4.1. Microscopía óptica

El funcionamiento de un microscopio óptico se basa en el empleo de un haz de fotones que incide sobre la muestra a observar y de una serie de lentes ópticas para crear una imagen aumentada de dicha muestra. Por lo general se utilizan microscopios compuestos, que disponen de varias lentes con las que se consigue aumentar la imagen hasta dos mil veces. Los microscopios ópticos actuales tienen un poder de resolución de $0,2 \mu\text{m}$, unas mil veces superior al del ojo humano.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se empleó la microscopía óptica tanto para el mantenimiento como para la experimentación con cultivos celulares, así como para la observación de cortes histológicos procedentes de los ensayos con animales. Los tipos de microscopía óptica utilizados fueron los siguientes:

Microscopía de contraste de fases.

El microscopio óptico de contraste de fases consta de un dispositivo, situado dentro o debajo del condensador, que produce una diferencia de un cuarto de longitud de onda en unos rayos luminosos con respecto a otros. Esto origina unas variaciones de luminosidad en los elementos estudiados, que permite diferenciarlos del resto de la muestra y observar con mayor detalle su estructura interna. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron varios microscopios de contraste de fases (Figura 3.11):

Durante el mantenimiento y el seguimiento de los experimentos con cultivos celulares se utilizó, de forma rutinaria, el microscopio invertido TMS de Nikon. Este microscopio permite la visualización de las muestras en diversos recipientes con espesores y características ópticas variables (frascos de cultivo, placas multipocillo, etc.) sin necesidad de preparación previa, lo que facilita la observación de los cultivos celulares vivos sin afectar a las condiciones de cultivo.

Para el recuento de células viables en la Cámara de Neubauer mediante el ensayo con azul tripán se utilizó el microscopio LABOPHOT-2 de Nikon.

Para la toma de fotografías de los cultivos celulares sometidos a diferentes procedimientos experimentales se utilizó un microscopio invertido ECLIPSE TE200-U de Nikon, equipado con una cámara fotográfica Nikon modelo DS Camera Head D-5M.



Figura 3.11. Microscopio invertido TMS de Nikon (panel izquierdo), microscopio LABOPHOT-2 de Nikon (panel central) y microscopio invertido ECLIPSE TE200-U (panel derecho).

Microscopía de fluorescencia

En un microscopio óptico de fluorescencia, la muestra es iluminada con un haz de luz de una determinada longitud de onda que excitará a determinadas moléculas de la muestra capaces de absorber fotones con esta longitud de onda. La imagen observada es el resultado de la radiación electromagnética emitida por estas moléculas que absorbieron la radiación primaria y, al desexcitarse, emiten luz con una longitud de onda mayor.

Estos microscopios presentan una lámpara que emite luz ultravioleta y luz visible, así como filtros de excitación que seleccionan determinadas longitudes de onda que excitan a los distintos fluorocromos.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizó la microscopía óptica de fluorescencia para la observación de cultivos celulares sometidos a tinción de Hoechst 33342. Se trata de un agente intercalante que es excitado por luz ultravioleta y emite fluorescencia azul. Las longitudes de onda máximas de excitación y emisión de este colorante son 350 nm y 461 nm respectivamente, cuando se encuentra unido al ADN. El microscopio de fluorescencia utilizado fue el microscopio invertido ECLIPSE TE200-U de Nikon acoplado a una lámpara de mercurio de alta presión.

Microscopía confocal

La microscopía láser confocal ofrece indudables ventajas frente a la microscopía óptica tradicional. Por un lado, ofrece imágenes de mayor nitidez y contraste, así como mayor resolución vertical y horizontal. Pero además, ofrece la posibilidad de obtener "secciones ópticas" de la muestra, lo que permite su estudio tridimensional. La mayor parte de las muestras observadas con microscopía óptica son traslúcidas o, en el caso de ser opacas, su superficie de reflexión no se encuentra perfectamente pulida. En ambos casos, la luz interacciona con la muestra a varias profundidades por lo que la imagen que llega al observador presenta áreas borrosas debidas a la luz procedente de zonas fuera del plano de enfoque, lo que produce una degradación en el contraste y resolución de la imagen.

El principio de la microscopía confocal se basa en eliminar la luz reflejada o fluorescente procedente de los planos fuera de foco. Para ello se ilumina una pequeña zona de la muestra y se toma el haz luminoso que proviene del plano focal, eliminándose los haces procedentes de los planos inferiores y superiores. Para ello, parte de la luz procedente de la fuente de iluminación atraviesa un primer diafragma, es reflejada mediante un espejo dicróico y se enfoca en un punto del espécimen mediante la lente de un objetivo. La señal emitida por el punto iluminado (fluorescencia o luz reflejada) vuelve por el mismo camino óptico, pasa a través del espejo dicróico y es enfocada en un detector. Delante del detector se coloca un segundo diafragma o *pinhole* para eliminar las señales procedentes de la zona fuera de foco.

La utilización de un láser como fuente de luz permite focalizar la iluminación en una región muy pequeña de la muestra y con una gran intensidad. Dado que sólo se ilumina una pequeña zona de la muestra (punto), para poder visualizarla se necesita un sistema de barrido que permita muestrear todos los puntos y un sistema de formación de la imagen donde se recoja la información de cada uno de estos puntos. El sistema de barrido puede ser de dos tipos: que el haz del láser se desplace por la muestra (*beam scanning*) o que sea ésta la que se desplace, mientras el haz permanece inmóvil

(*stage scanning*). El tipo de microscopía confocal más utilizada es aquel en el que el haz del láser barre la muestra y se denomina *Confocal Láser Scanning Microscopy (CLSM)*.

La luz reflejada o fluorescencia emitida por la muestra es recogida en un fotomultiplicador donde se transforma en una señal de vídeo que se digitaliza y se almacena en un ordenador, visualizándose a través de un monitor. La mayoría de los sistemas cuentan con varios fotomultiplicadores y un sistema óptico que permite recoger, en cada uno de ellos, diferentes longitudes de onda.

La fluorescencia se define como la propiedad que tienen ciertas moléculas de absorber luz de una determinada longitud de onda y emitir luz en una longitud de onda superior. La fluorescencia puede darse de forma natural en determinadas sustancias (clorofila, algunos tejidos frescos, etc.), denominándose fluorescencia primaria o autofluorescencia. En otros casos, para que la muestra que queremos observar tenga fluorescencia, es preciso teñirla con un marcador fluorescente denominado fluorocromo. En este caso hablaríamos de fluorescencia secundaria. Existe una gran cantidad de fluorocromos que, en sí mismos, marcan de forma selectiva diversos componentes celulares o tisulares. Pero además, podemos asociar estos fluorocromos a proteínas o anticuerpos dirigidos específicamente frente a determinados componentes celulares o tisulares para facilitar su estudio.

Los fluorocromos se caracterizan por su espectro de excitación y su espectro de emisión. El espectro de excitación es el rango de longitudes de onda en las que un fluorocromo absorbe luz. El espectro de emisión es el rango de longitudes de onda en las que un fluorocromo emite luz. Cada uno de estos espectros de excitación y de emisión presenta un pico que se corresponde con la longitud de onda máxima de absorción y con la longitud de onda máxima de emisión, respectivamente. Por tanto, es necesario utilizar fuentes de iluminación capaces de emitir luz de la longitud de onda óptima para excitar a cada fluorocromo. Para ello, los microscopios confocales están equipados con un juego de láseres que emiten luz a longitudes de onda concretas que coinciden con los máximos de excitación de los distintos fluorocromos. Normalmente un microscopio confocal viene con varios láseres que tienen una o varias líneas de emisión: Argón (458, 476, 488, 496 y 514nm), Helio-Neón (543nm), Helio-Neón (633nm), Diodo azul (405 nm), etc. Los fluorocromos más utilizados durante la realización de esta Tesis Doctoral fueron:

- 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI): es un colorante fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en pares AT del ADN. Cuando se encuentra unido a ADN de doble cadena presenta un máximo de excitación a 358 nm (ultravioleta) y un máximo de emisión a 461 nm (azul).
- Isotiocianato de fluoresceína o fluoresceína-5-isotiocianato (FITC): presenta un máximo de excitación a 492 y un máximo de emisión a 518 nm (verde).
- Alexa Fluor 488: presenta un máximo de absorción a 488 nm y un máximo de emisión a 519 nm (verde). Sus propiedades espectrales son muy similares a las del FITC, pero permite generar conjugados más brillantes y fotoestables.
- Alexa Fluor 633: presenta un máximo de absorción a 632 y un máximo de emisión a 647 (rojo).

Los ensayos de microscopía confocal se llevaron a cabo en la Sección de Microscopía de la Universidad de Murcia que dispone de un microscopio láser confocal Leica TCS-SP2 (Leica Microsystems) (Figura 3.12). Esta técnica se utilizó para el análisis de la incorporación y el transporte celular de compuestos unidos a fluorocromos en células *in vivo*, así como para el análisis de la localización y la abundancia de determinadas proteínas celulares en una situación control y tras someter a las células a diversas condiciones (tratamiento con distintos compuestos, silenciamiento génico, etc.). En este último caso, las células fueron fijadas y procesadas previamente a la observación.



Figura 3.12. Microscopio confocal Leica TCS-SP2 (panel izquierdo). Placas *Glass Bottom Dishes* empleadas para la visualización de células vivas (panel derecho).

Procedimiento para células vivas:

La visualización de células *in vivo* mediante microscopía confocal se utilizó para el estudio de la incorporación y el transporte celular de compuestos unidos a fluorocromos. Para ello, las células se sembraron en placas Petri de plástico de 3.5 cm de diámetro que presentaban una hendidura circular en el centro con el fondo de cristal (*Glass Bottom Dishes* de MatTek Corporation) (Figura 3.12). Posteriormente, las células se sometieron al tratamiento con los compuestos marcados con fluorocromos a la concentración y tiempo correspondientes. Finalmente, se lavaron con abundante PBS y se observaron en el microscopio confocal retirando la tapa de la placa y añadiendo una cantidad de PBS suficiente para que la muestra no se seque.

Procedimiento para células fijadas:

Para el estudio de la abundancia y la distribución de proteínas celulares, las células se sembraron en placas Petri de 3.5 cm de diámetro en las que previamente se había introducido un cubreobjetos esterilizado con etanol 70° a la llama. Estas células se sometieron a diversos procesos (silenciamiento génico, tratamiento con compuestos, etc.) y, previamente a la visualización, se realizó una inmunofluorescencia indirecta. Para ello, en primer lugar, se eliminó el medio de cultivo y se lavaron las células dos veces con PBS. A continuación, las células se fijaron con acetona fría durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se retiró el fijador y se lavaron las células 4 veces con abundante PBS frío. Seguidamente, se bloquearon las uniones inespecíficas mediante incubación con albúmina de suero bovino (BSA) al 3-5% (p/v) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación, las muestras se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo primario dirigido frente a la proteína que deseábamos marcar. El anticuerpo se diluyó en BSA al 1% (p/v) en PBS a la concentración indicada por el proveedor. Posteriormente, las muestras se lavaron 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora con los anticuerpos secundarios (*ALEXA Fluor Dyes*; Life

Technologies) conjugados con el fluorocromo adecuado a una dilución 1/200 en BSA al 1% (p/v) en PBS. A continuación, se lavó 3 veces con PBS en agitación durante 5 minutos, se retiró el exceso de líquido y se montó el cubreobjetos sobre un portaobjetos utilizando el medio de montaje *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (Life Technologies) que contiene en su composición el colorante DAPI que tiñe los núcleos de azul a la vez que preserva la muestra y evita que se apague la fluorescencia.

3.2.4.2. Microscopía electrónica

La microscopía electrónica se rige según los mismos principios básicos que la microscopía óptica, pero utilizando un haz de electrones en lugar de un haz de fotones. El poder de resolución de un microscopio óptico es de 0.2 μm y está limitado por la longitud de onda de la luz. Sin embargo, el microscopio electrónico, dada la menor longitud de onda de los electrones, tiene un poder de resolución de 0.2 nm, lo que permite el estudio de la ultraestructura celular.

Los microscopios electrónicos constan de una columna sometida a alto vacío en cuya parte superior presenta un cañón electrónico que genera un haz de electrones que es acelerado al ser sometido a un alto voltaje. Este haz de electrones es enfocado gracias a una serie de lentes electromagnéticas y se dirige hacia la muestra que se desea aumentar. La amplificación se produce por un conjunto de lentes electromagnéticas que forman una imagen sobre una placa fotográfica o sobre una pantalla sensible al impacto de los electrones que transfiere la imagen formada a la pantalla de un ordenador. Existen dos tipos principales de microscopios electrónicos:

Microscopio electrónico de transmisión (MET)

El MET permite la observación a través del espécimen (transiluminación). La muestra se procesa y se corta en láminas ultrafinas (del orden de nanómetros) que se colocan en una rejilla de cobre, la cual es bombardeada con un haz de electrones enfocado. Cuando los electrones inciden sobre la muestra, parte serán totalmente desviados, parte la atravesarán directamente y parte la atravesarán con distintos grados de dispersión en función del grosor de dicha muestra y del tipo de átomos que la forman. Todos ellos son conducidos y modulados por unas lentes electromagnéticas para formar una imagen final que se proyecta sobre una pantalla fluorescente o una placa fotográfica situada debajo de la muestra. Se obtiene una imagen con distintas intensidades de gris que se corresponden al grado de dispersión de los electrones incidentes. Los MET tienen un poder de resolución de hasta 0.2 nm.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizó esta técnica para la observación de los melanosomas presentes en melanocitos sometidos a distintos tratamientos. El gran poder de resolución alcanzado con el MET permitió detectar diferencias no solo en cuanto a la cantidad de melanosomas presentes en las células de melanoma tratadas con las distintas drogas, sino también en cuanto al tamaño de estos orgánulos, e incluso en cuanto a su contenido de melanina.

Procedimiento para la preparación de las muestras:

En primer lugar, se obtuvo una fracción vesicular rica en melanosomas, a partir de extractos celulares, mediante centrifugación diferencial. Estos melanosomas se sometieron a fijación durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón cacodilato sódico (0.1 M, pH 7.3) conteniendo glutaraldehído y paraformaldehído al 2%. A continuación, se retiró el fijador y las muestras se

mantuvieron a 4°C en sacarosa al 4% en PBS. Posteriormente las muestras fueron sometidas a deshidratación con concentraciones crecientes de etanol (30°, 50°, 70°, 90° y 100°), se lavaron con óxido de propileno al 100% (ya que la resina epoxi no es soluble en etanol) y se incluyeron en resina epoxi. Una vez incluidas, las muestras se cortaron con ayuda del ultramicrotomo. En primer lugar, se obtuvieron unos cortes semifinos que se tiñeron con azul de toluidina para localizar la zona adecuada del bloque. Posteriormente, se obtuvieron cortes ultrafinos, que se colocaron sobre las rejillas que se tiñeron con citrato de plomo y acetato de uranilo. Para la observación de las muestras se utilizó el microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM10 ubicado en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia (Figura 3.13).

Microscopio electrónico de barrido (MEB)

El MEB permite la observación de la superficie de un espécimen sólido (epi-iluminación) y se producen imágenes en 3D gracias a una mayor profundidad de campo. La muestra generalmente es recubierta con una capa de carbono o una capa delgada de un metal como el oro para darle propiedades conductoras. La superficie del espécimen se escanea con un haz de electrones (primarios) y los electrones que rebotan (secundarios) son recogidos por un detector. La señal se observa en un monitor de televisión. Los MEB tienen un poder de resolución de entre 4 y 20 nm, dependiendo del microscopio.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se utilizó esta técnica para analizar los efectos producidos por los distintos tratamientos sobre la morfología de las células de melanoma.



Figura 3.13. Microscopio electrónico de transmisión ZEISS EM10 (panel izquierdo). Microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 (panel derecho).

Procedimiento para la preparación de las muestras:

En primer lugar, las células de melanoma se sembraron en placas Petri de 3.5 cm de diámetro conteniendo cubreobjetos de vidrio previamente esterilizados con etanol 70° a la llama. Las células se sometieron al tratamiento con los correspondientes agentes a la concentración y tiempo deseados. Las muestras celulares se lavaron y se sometieron a fijación con glutaraldehído al 3% en tampón cacodilato 0.1 M durante 3-5 horas. Posteriormente, se lavaron con tampón cacodilato con sacarosa durante toda la noche y se sometieron a post-fijación con tritóxido al 1% durante 1-2 horas. A continuación, se volvieron a lavar en tampón cacodilato con sacarosa durante toda la noche y se sometieron a deshidratación con concentraciones crecientes de acetona.

Por último las muestras se trataron con acetona pura y CO₂ líquido y fueron recubiertas con una capa de oro utilizando el metalizador Bio-Rad Polaron Division (200a). Las preparaciones se visualizaron utilizando el microscopio electrónico de barrido JEOL-6100 ubicado en el Servicio de Microscopía de la Universidad de Murcia.

3.2.5. INMUNOHISTOQUÍMICA E INMUNOHISTOFLUORESCENCIA

La inmunohistoquímica (IHQ) es una técnica que permite la detección de un antígeno en secciones de tejidos gracias al uso de anticuerpos dirigidos específicamente frente a dichos antígenos. Para poder visualizar la unión antígeno-anticuerpo se utilizan anticuerpos marcados por su unión a enzimas como la peroxidasa que, al actuar sobre ciertos sustratos, da lugar a un producto coloreado. Una variante de esta técnica es la inmunohistofluorescencia (IHF) que utiliza anticuerpos marcados con fluorocromos para la detección de antígenos en dichas secciones de tejidos. Tanto la IHQ como la IHF se pueden llevar a cabo mediante un método directo o mediante un método indirecto. En el caso del método directo, el anticuerpo específico frente al antígeno que se desea detectar está unido directamente a una enzima o bien a un fluorocromo. En el método indirecto, el anticuerpo dirigido frente al antígeno que se desea detectar (anticuerpo primario) no está marcado, sino que se emplea un segundo anticuerpo, dirigido específicamente frente al primer anticuerpo, que está marcado por su unión a una enzima o a un fluorocromo (anticuerpo secundario). Existen diversas estrategias que permiten amplificar la señal de estos métodos indirectos basadas en la gran afinidad que presentan la estreptavidina (de *Streptomyces avidinii*) o la avidina (del huevo) por la vitamina biotina. Estos métodos, utilizan un anticuerpo secundario biotinilado y unos complejos formados por la unión de estreptavidina o avidina a la enzima peroxidasa, de manera que se consigue que, por cada unión antígeno-anticuerpo primario-anticuerpo secundario, haya múltiples moléculas de peroxidasa, lográndose un considerable aumento de la sensibilidad de detección del antígeno.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se realizó IHQ e IHF de muestras histológicas mediante el método indirecto, utilizando anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa y con fluorocromos respectivamente (Figura 3.14).

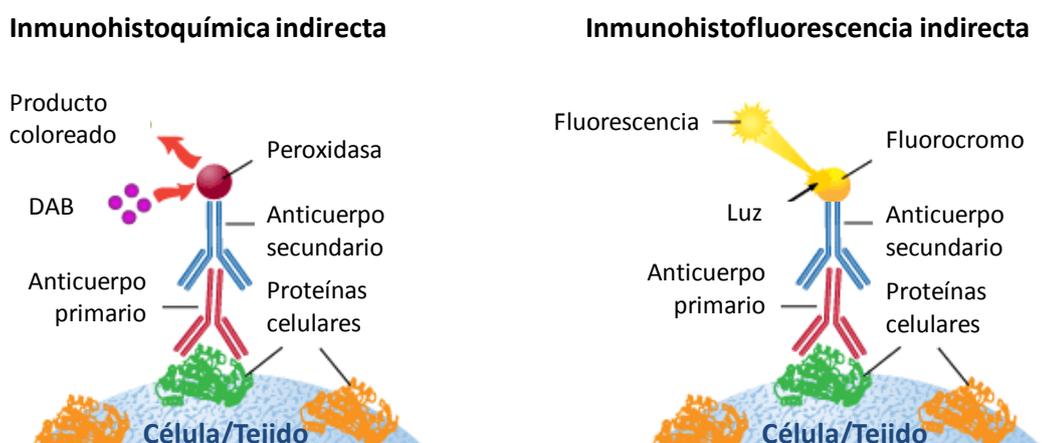


Figura 3.14. Esquema de los métodos de inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia indirectos.

Procedimiento:

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

En primer lugar, las muestras de tejido fresco se sometieron a fijación con formaldehído al 10% durante, al menos, 12 horas para mantener su morfología y composición lo más parecidas posible al estado *in vivo*. Esto se logra gracias a que el fijador provoca la generación de enlaces cruzados entre proteínas, lo que mantiene las estructuras celulares e inactiva ciertas enzimas celulares que, de otra manera, iniciarían la autólisis y la degeneración *post mortem*. A continuación, las muestras de tejido fijado se sometieron a deshidratación mediante una serie de pases por alcohol etílico de concentración creciente (un pase de 1 hora en etanol 50°, un pase de 1 hora en etanol 70°, dos pases de 1 hora en etanol 96°, dos pases de 1 hora en etanol 100°). Tras la deshidratación, se procedió al aclaramiento de las muestras mediante dos pases de 1 hora en sustitutivo de xilol, con el objetivo de embeberlas en una sustancia miscible con la parafina. A continuación, se realizó un pase más de 1-2 horas en una mezcla de parafina líquida y sustitutivo de xilol al 50%. P

Por último, las muestras se incluyeron en parafina mediante dos pases, de 4 y 6 horas de duración, en parafina líquida en la estufa a 57-60°C. Durante este proceso, la parafina penetra en los espacios inter e intracelulares, embebiendo todo el tejido para facilitar la posterior obtención de cortes. Para la generación de bloques, las piezas de tejido embebidas en parafina se colocaron en un molde rectangular que contenía parafina fundida y se dejaron enfriar. Una vez obtenidos los bloques, se realizaron secciones de 5 µm de espesor utilizando un micrótopo Leica RM2155 (Leica Microsystems) y estas secciones se adhirieron a portaobjetos con recubrimiento de polilisina mediante incubación en la estufa a 37°C durante 2 horas.

Desparafinado e hidratación de los cortes histológicos

Una vez obtenidos los cortes de tejido, se marcó en los portaobjetos el área de la muestra con un lápiz de diamante. A continuación, se procedió al desparafinado y rehidratación de los cortes mediante dos pases de 5 minutos en sustitutivo de xilol, un pase de 3 minutos en etanol 100°, un pase de 3 minutos en etanol 96°, un pase de 3 minutos en etanol 70° y un pase de 5 minutos en agua.

Desenmascaramiento antigénico

La fijación con formaldehído provoca la disminución o incluso la pérdida de inmunorreactividad del tejido debido a que da lugar a la formación de enlaces cruzados intra e interproteicos que alteran la estructura tridimensional de los antígenos. Aunque algunos antígenos son resistentes al procesamiento con formaldehído, la mayoría de los epítomos antigénicos pierden su reactividad inmunológica tras el procesamiento de rutina y necesitan ser recuperados. Para poder determinar estos antígenos se han desarrollado técnicas de desenmascaramiento antigénico tales como tratamiento proteolítico (con pronasa, proteinasa K, tripsina, pepsina, etc.) o el tratamiento con calor en soluciones tamponadas con un pH determinado. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se realizó desenmascaramiento antigénico de las muestras con proteinasa K. Para ello se cubrieron las muestras de tejido con una disolución de proteinasa K (20 µg/mL) en tampón TE-T (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 0.5%, pH 8) y se incubaron en una cámara húmeda durante 15 minutos a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron con PBS durante 3 minutos en una jarra Coplin.

Inhibición de la actividad peroxidasa endógena

Algunos tejidos presentan una elevada actividad peroxidasa endógena que puede dar lugar a tinción inespecífica al realizar inmunohistoquímica con anticuerpos conjugados con peroxidasa. Durante la realización de esta Tesis Doctoral, para bloquear la actividad peroxidasa endógena del tejido, se sumergieron las muestras en una solución de H₂O₂ al 3% en metanol en un recipiente Coplin protegido de la luz durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las muestras se sometieron a un lavado en PBS durante 5 minutos, seguido de otro lavado de 5 minutos en PBT (PBS conteniendo un 0.05% (v/v) de Tween-20).

Bloqueo de las uniones inespecíficas

Previamente a la incubación con los anticuerpos, las muestras fueron incubadas con BSA al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda para bloquear las uniones inespecíficas del tejido. Tras el bloqueo, las muestras se lavaron dos veces en PBT durante 5 minutos.

Inmunohistoquímica o Inmunohistofluorescencia

Tras el bloqueo de las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron con los anticuerpos primarios diluidos en BSA al 1% en PBS durante la noche a 4°C a la concentración indicada por el fabricante. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las muestras se lavaron dos veces con PBT durante 5 minutos y se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa (en el caso de IHQ) o con fluorocromos (en el caso de IHF) diluidos en BSA al 1% en PBS a la concentración indicada por el fabricante durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras la incubación con los anticuerpos secundarios, las muestras se lavaron dos veces con PBS durante 5 minutos.

En el caso de la IHQ, la actividad peroxidasa de las muestras se reveló mediante incubación con el sustrato de la peroxidasa 3, 3'-diaminobenzidina (DAB) que, al ser oxidado por la peroxidasa, da lugar a un producto marrón-anaranjado en aquellos lugares donde se localiza el antígeno de interés. Para ello, se sumergieron las muestras en una jarra Coplin conteniendo una disolución formada por 25 mg de DAB y 25 µL de H₂O₂ en 50 mL de PBS, entre 1 y 10 minutos, para permitir el desarrollo del marcaje marrón-anaranjado. Tras esta incubación, las muestras se lavaron con agua destilada y se visualizaron al microscopio para comprobar la intensidad del marcaje.

En el caso de la IHF, tras la incubación con los anticuerpos y los lavados, se procedió directamente al montaje de las preparaciones.

Tinción con hematoxilina-eosina

Tras el revelado de la actividad peroxidasa, las muestras sometidas a IHQ se tiñeron con hematoxilina-eosina para dar mayor contraste al tejido y facilitar la identificación de las estructuras celulares y tisulares. Para ello, los portales se introdujeron durante 10 minutos en Hematoxilina de Mayer. A continuación, se lavaron con agua del grifo hasta eliminar los restos de colorante. Seguidamente, se introdujeron en eosina alcohólica durante 30 segundos y se lavaron con alcohol de 70°.

Deshidratación

Tras la tinción con hematoxilina-eosina, las muestras de IHQ se sometieron a deshidratación mediante un pase de 2 minutos en etanol de 96° y un pase de 2 minutos en etanol de 100°. Por último, se aclararon mediante un pase de 3 minutos en sustitutivo de xilol.

Montaje de las preparaciones

En el caso de la IHF, las preparaciones se montaron directamente tras la incubación con los anticuerpos secundarios. Para ello, se eliminó el exceso de líquido, se añadió junto a la muestra una gota de medio de montaje *ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI* (Life Technologies) y se colocó el cubreobjetos. Las muestras se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente y, una vez secas, se sellaron con esmalte de uñas y se almacenaron a -80°C en oscuridad hasta su visualización en el microscopio.

En el caso de la IHQ, tras el revelado de la actividad peroxidasa, la tinción con hematoxilina-eosina y la deshidratación de las muestras, se montaron las preparaciones mediante la adición de una gota de medio de montaje junto a la muestra y la colocación de un cubreobjetos. Las muestras procesadas mediante IHQ se conservaron a temperatura ambiente.

3.2.6. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica biofísica que permite el recuento y la clasificación de las células según sus características morfológicas y la presencia de biomarcadores. En los citómetros de flujo, las células suspendidas en un fluido atraviesan un finísimo tubo transparente sobre el que incide un láser de luz focalizado. El impacto de cada célula con el rayo de luz produce señales, que corresponden a diferentes parámetros de la célula, y que son recogidos por distintos detectores. Estos detectores, convierten dichas señales en señales electrónicas que, posteriormente, serán digitalizadas permitiendo la medida simultánea de diferentes parámetros en una misma célula.

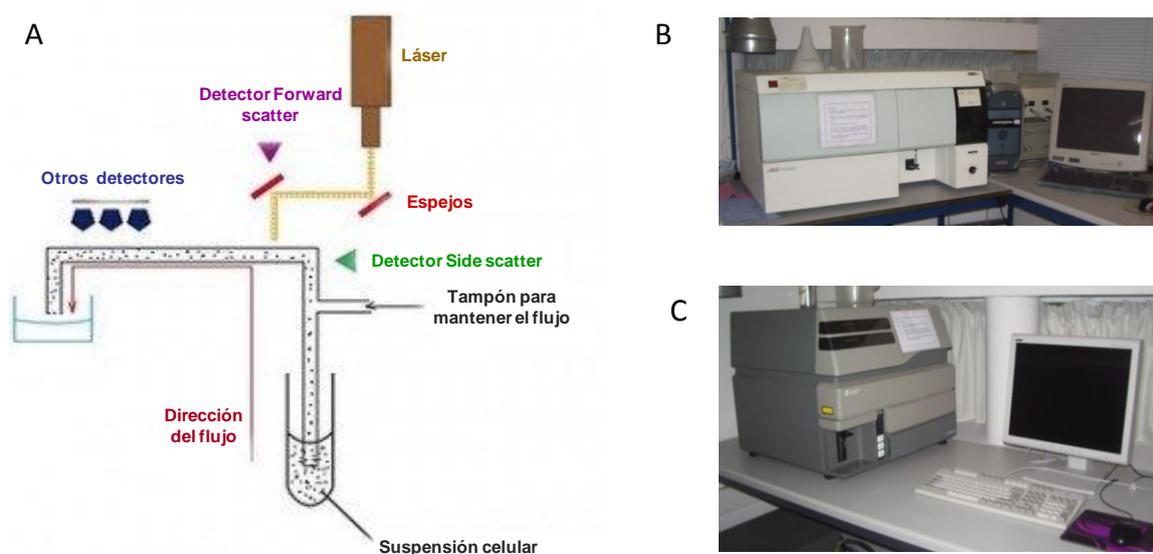


Figura 3.15. (A) Esquema de los componentes de un citómetro de flujo. (B) Citómetro de flujo FACS Sort. (C) Citómetro de flujo Coulter Epics XL.

En el momento de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas, pero obligatoriamente éstas tienen que estar en suspensión y en forma de célula única. Al hacerlas pasar alineadas una a una frente al haz del láser mediante un flujo continuo, cada célula, a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que está sometida. Los parámetros que típicamente se miden de forma simultánea para cada célula son: dispersión frontal de la luz (FSC, acrónimo del inglés *forward scatter*) que es un valor proporcional al tamaño celular, dispersión ortogonal de la luz (SSC, acrónimo del inglés *side scatter*), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula y, por último, intensidades de fluorescencia a diferentes longitudes de onda, dependiendo de los fluorocromos que se utilicen para marcar determinadas biomoléculas. Los aparatos de citometría de flujo pueden hacer un análisis multiparamétrico, combinando las medidas de los distintos parámetros medidos sobre la misma célula y relacionarlos (Figura 3.15).

Los componentes de un citómetro de flujo son: el sistema fluídico, la óptica láser, los detectores electrónicos, los convertidores analógico-digitales y un ordenador. Los sistemas ópticos permiten el enfoque del láser en un haz con un diámetro reducido para impactar sobre el menor número de partículas posibles simultáneamente. El sistema fluídico permite un enfoque hidrodinámico del flujo celular hasta conseguir el alineamiento de las células. El sistema electrónico se encarga de la cuantificación de los destellos de fluorescencia y de la luz dispersada. Los convertidores analógico-digitales se encargan de procesar las señales. El uso de distintos fluorocromos para detectar diferentes biomoléculas permite analizar la presencia de varios marcadores de manera simultánea. Si el análisis incluye la detección de fluorescencia hablamos estrictamente de citofluorímetros de flujo, conocidos como FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*). El ordenador permite almacenar datos de miles de células por cada muestra y representar los resultados gráficamente, tanto en formato de diagrama de puntos o *dot-plot* (representación de dos parámetros, uno frente a otro en un eje cartesiano) como en formato de histograma (representación de un parámetro en el eje X y del número de células en el eje Y) (Figura 3.16).

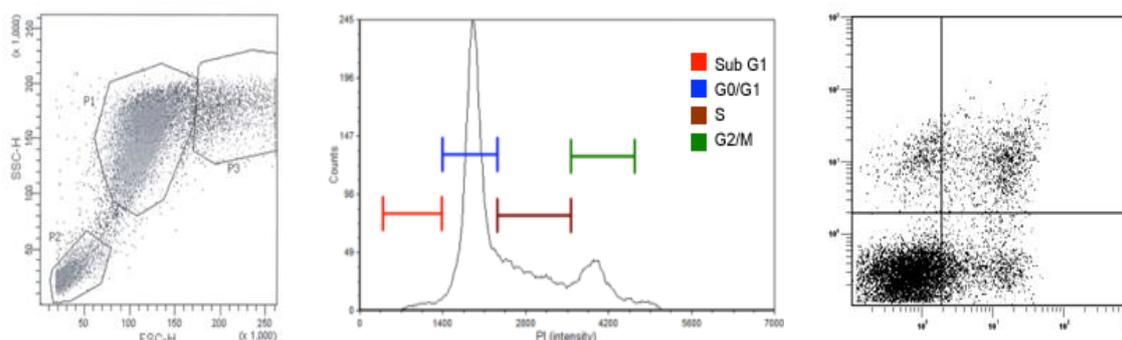


Figura 3.16. Diagrama de puntos FSC / SSC (panel izquierdo). Histograma mostrando las distintas fases del ciclo celular (panel central). Típico diagrama de puntos de células con un doble marcaje con fluorescencia (panel derecho).

La citometría de flujo se realiza en 3 etapas:

Fase pre-citometría: preparación de los reactivos, procesamiento de las células y tinción de las células con los reactivos fluorescentes.

Fase de citometría de flujo: adquisición en el citómetro de las células marcadas y recolección de los datos de cada parámetro para cada célula individual.

Fase de análisis: análisis de los datos recolectados mediante programas informáticos.

Durante la realización de este trabajo, la citometría de flujo se empleó para la determinación de la apoptosis en poblaciones celulares mediante ensayo con Anexina V, como se describe en el apartado 3.2.2.2. de esta memoria, y para el análisis del ciclo celular, como se describe a continuación.

3.2.6.1. Análisis del ciclo celular

La citometría de flujo permite conocer la cantidad de ADN que hay en cada célula. Para ello, se marca la suspensión celular con yoduro de propidio, un colorante fluorescente que se une estequiométricamente al ADN, de manera que la cantidad de colorante unido es proporcional a la cantidad de ADN que tienen las células. Las células teñidas se introducen en el citómetro y la luz fluorescente emitida es proporcional al contenido de ADN de cada célula. Este análisis nos da información sobre la distribución de las células en las diferentes fases del ciclo celular (G1, S, G2 o M). Sin embargo, no es posible diferenciar G2 y M, ya que en las dos se encuentra el mismo contenido de ADN. Para establecer el porcentaje de células que se encuentran en cada fase se emplean modelos matemáticos que permiten ajustar curvas gaussianas a la distribución de las poblaciones.

Procedimiento

En primer lugar, se preparó una suspensión celular de 1×10^6 células en 200 μL de PBS (previamente despegadas y contadas). Las células se fijaron mediante incubación con 2 mL de una mezcla etanol/PBS (70/30) a 4°C en agitación durante 30 minutos en hielo. A continuación, se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendieron convenientemente en 800 μL de PBS para evitar que las células quedaran adheridas entre sí. Posteriormente, se pasaron a un tubo de citometría, se añadieron 100 μL de RNasa (1 mg/mL) y 100 μL de yoduro de propidio (400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubaron a 37°C en oscuridad durante 1 hora. Finalmente, las células marcadas se adquirieron haciéndolas pasar a través de un citómetro de flujo FACSsort (Becton Dickinson) con un láser de Argón de 488 nm. Los datos se analizaron con los programas *Cell Quest* y *Modfit*.

3.3. TÉCNICAS DE BIOQUÍMICA

3.3.1. ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas que se basa en el movimiento que experimenta cualquier molécula cargada al ser sometida a un campo eléctrico. Las técnicas electroforéticas son muy utilizadas para purificar y caracterizar moléculas cargadas como los ácidos nucleicos y las proteínas, pudiendo utilizarse con fines analíticos y/o preparativos. Existen diversos tipos de electroforesis (de frente móvil, zonal y continua), pero la más utilizada es la electroforesis zonal. Ésta se caracteriza porque la disolución en la que se encuentran las moléculas está incluida en un soporte sólido que forma una malla molecular con poros, a través de los cuales deben pasar las moléculas cargadas. La mezcla de moléculas a separar se coloca en una zona estrecha de manera que, al aplicar un campo eléctrico, las partículas con diferente movilidad migran a través del soporte como bandas estrechas. Como soporte se utilizan medios inertes y homogéneos, como papel, acetato de celulosa y geles de almidón, poliacrilamida o agarosa. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizaron geles de poliacrilamida para la separación de proteínas (apartado 3.3.1.1) y geles de agarosa para la separación de ácidos nucleicos (apartado 3.4.5).

3.3.1.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico: SDS-PAGE

La electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida es una de las técnicas más utilizadas para la separación de mezclas complejas de proteínas. Se trata de un método práctico, rápido y económico a nivel de muestra, puesto que solo se necesitan cantidades de proteína del orden de microgramos.

Los geles de poliacrilamida presentan una serie de propiedades que los hacen ser un excelente medio de soporte para la separación de proteínas: transparencia, elasticidad, compatibilidad con una gran variedad de compuestos químicos y porosidad controlable. Estos geles de poliacrilamida son el resultado de la polimerización química de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida (N,N'-metilén-bis-acrilamida), donde la acrilamida forma largas cadenas lineales y la bis-acrilamida da lugar a puntos de ramificación que entrecruzan las cadenas de acrilamida. La polimerización se inicia por adición de persulfato amónico y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletiléndiamina). En este sistema, el anión persulfato se descompone formando radicales libres que inician la reacción de polimerización pero son poco estables. El TEMED, en presencia de estos radicales sulfato, forma radicales libres estables, contribuyendo a que la polimerización continúe. Así, se origina una matriz tridimensional cuyo tamaño de poro depende de las concentraciones de acrilamida y de bis-acrilamida. En la práctica, variando la concentración de acrilamida y bis-acrilamida se consiguen geles con distinto grado de porosidad, adecuados al rango de tamaño molecular de las proteínas que se desea separar.

El pH al que la carga eléctrica neta de una proteína es cero constituye su punto isoeléctrico (pI). Por tanto, cuando las proteínas se encuentran en un medio con un pH distinto a su pI presentarán una carga neta. De esta manera, las proteínas tienen la propiedad de desplazarse al ser sometidas a un campo eléctrico. Puesto que el tamaño de poro de los geles de poliacrilamida es del mismo orden que el tamaño de las proteínas a separar, tiene lugar un efecto de tamizado molecular, de manera que la separación de las proteínas será dependiente tanto de la carga como del tamaño de la

proteína. Así, la velocidad de migración es proporcional a la relación entre la carga de la proteína y su masa, de manera que cuanto mayor es la carga por unidad de masa, más rápida será su migración.

En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturizado) a lo largo del proceso electroforético, las electroforesis se clasifican en nativas o desnaturizantes. En las electroforesis nativas se somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación, las proteínas migran en función de su carga, tamaño y forma. En este tipo de electroforesis se mantienen, en ciertos casos, las interacciones entre subunidades y entre proteínas, pudiendo llegar a separarse complejos proteicos. Sin embargo, el tipo de electroforesis más comúnmente utilizada es la electroforesis desnaturizante en la que se somete a las proteínas a migración asegurando su completa desnaturalización (pérdida de su estructura tridimensional). En esta situación, la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula, pero no a su forma. El agente desnaturizante más empleado es el β -mercaptoetanol que actúa rompiendo los puentes disulfuro (Figura 3.17).

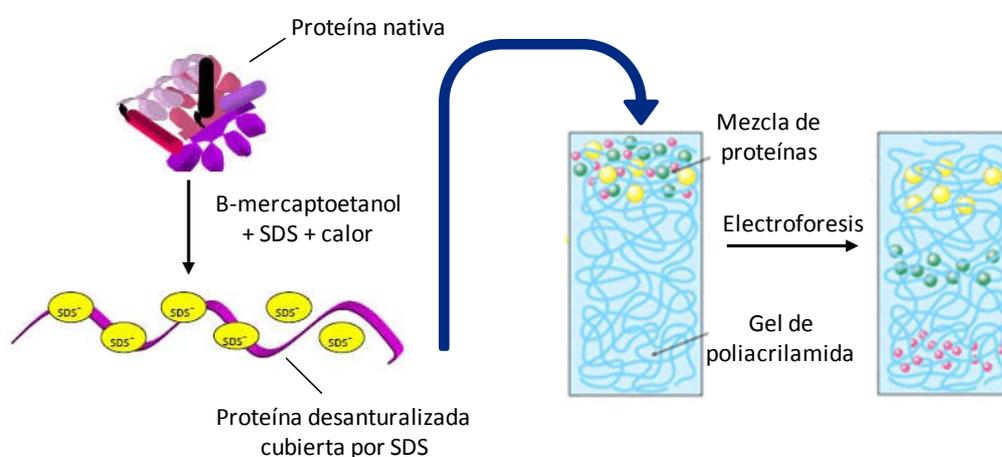


Figura 3.17. Efecto del tratamiento con β -mercaptoetanol, SDS y calor sobre las proteínas de la muestra y separación de las mismas en función de su tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida.

Entre las diversas técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE, acrónimo del inglés *polyacrylamide gel electrophoresis*) la más utilizada es la que se realiza en presencia del detergente aniónico dodecilsulfato sódico (SDS), denominada SDS-PAGE. En esta técnica, las muestras se mezclan previamente a su fraccionamiento con un tampón que contiene SDS y, además, este detergente estará presente durante todo el proceso de separación (tanto en los geles como en el tampón de electroforesis). El SDS tiene la propiedad de unirse a las proteínas en una proporción constante, de aproximadamente 1.4 g SDS/g proteína, por lo que la carga de las proteínas queda enmascarada por la carga negativa de las múltiples moléculas de SDS y será proporcional al tamaño (número de aminoácidos). Así, la relación carga/masa queda igual para todas las proteínas y, al ser sometidas a un campo eléctrico en un gel poroso, éstas se van a separar fundamentalmente en función de su peso molecular (Figura 3.17). De esta manera, a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína y viceversa.

Para llevar a cabo la electroforesis se necesita una fuente de tensión que proporciona el campo eléctrico mediante dos electrodos, uno positivo (ánodo) y uno negativo (cátodo), entre los que se establece una diferencia de potencial; y una cubeta o recipiente en cuyos extremos se sitúan los electrodos.

En el interior de la cubeta se introduce el soporte electroforético (el gel de poliacrilamida) y el tampón de electroforesis, el cuál es necesario ya que durante la electroforesis se produce la electrolisis del agua, generándose protones en la proximidad del ánodo e iones hidroxilo en la proximidad del cátodo, y el tampón evitará que el entorno anódico se acidifique y el catódico se haga más básico a lo largo de la electroforesis.

El método actual para la realización de una SDS-PAGE fue descrito por Laemmli en 1970. Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (β -mercaptoetanol y SDS) y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas. Esta técnica posee un alto poder de resolución que se deriva del uso de un sistema electroforético discontinuo, formado por dos geles de distinta porosidad y pH. El gel superior o concentrador (4% de acrilamida) concentra las proteínas de la muestra, las cuales serán separadas por el gel inferior o separador. En el gel separador, la movilidad está restringida por el tamaño de poro, el cual depende de la concentración de acrilamida y bisacrilamida del gel. Así, si se pretende resolver componentes de muy alto peso molecular se utilizan geles al 5% o al 7.5%, mientras que si se pretende separar proteínas más pequeñas o péptidos se utilizarán geles al 15-20%, que tendrán un diámetro de poro menor. Los geles de tamaño de poro intermedio (10-12%) son adecuados para la separación de proteínas de entre 10 y 90 KDa. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, las electroforesis se realizaron siguiendo este método (Laemmli, 1970) utilizando el sistema Mini-Protean 3 de BioRad (Figura 3.18).

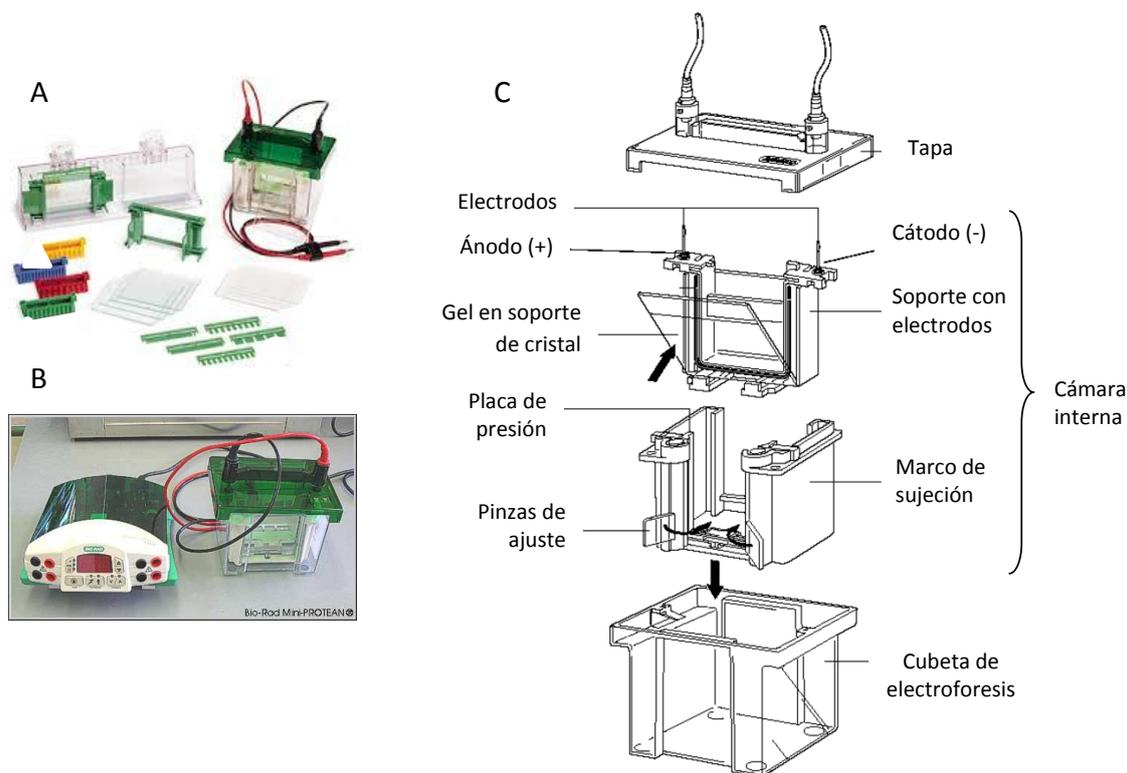


Figura 3.18. (A) Componentes del sistema *Mini Protean 3* de Bio-Rad Laboratories. (B) Sistema conectado a la fuente de tensión. (C) Esquema del montaje del sistema en la cubeta de electroforesis.

Procedimiento:Preparación del tampón de muestra desnaturizante:

Para preparar dos mL de tampón de muestra desnaturizante se añaden los siguientes componentes en las cantidades indicadas:

Componente	Cantidad
TRIS-HCl 0.5 M, pH 6.8	500 μ L
SDS 10%	800 μ L
Glicerol	0.4 g
β -mercaptoetanol	200 μ L
Azul de bromofenol 0.2%	100 μ L

El tampón TRIS-Cl permite mantener estable el pH; el SDS es esencial en la SDS-PAGE puesto que rompe las uniones no covalentes entre las subunidades y desnaturiza las proteínas, eliminando el efecto de la forma en la movilidad electroforética de éstas. Además, el SDS se une a las proteínas aportándoles una gran carga negativa proporcional al tamaño de éstas, por lo que enmascara la carga intrínseca de las proteínas y hace que éstas migren en función de su tamaño pero no de su carga. El glicerol aumenta la densidad de las muestras para que éstas permanezcan en el fondo de los pocillos y no difundan al depositarlas en el gel. El β -mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro de las proteínas, tanto intra- como intercatenarios, contribuyendo a su desnaturización. El azul de bromofenol es un colorante que se utiliza como marcador de avance del proceso electroforético puesto que, al presentar carga negativa a pH superior a 4.6, migra hacia el ánodo y, al tener un tamaño muy pequeño, adelanta a la mayoría de proteínas. Cuando el colorante se aproxima al extremo anódico del gel, se debe desconectar la corriente y dar por finalizada la electroforesis.

Preparación de las muestras:

Las muestras se mezclan con el tampón de muestra desnaturizante en la proporción adecuada y se calientan a 95-100°C durante 5 minutos en un bloque calefactor para asegurar la desnaturización.

Para poder calcular el peso molecular de las proteínas se utiliza una mezcla de marcadores preteñidos formada por proteínas patrón de peso molecular conocido. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon los marcadores pre-teñidos *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories) cuyos pesos moleculares varían entre 10 y 250 kDa y se separan dando lugar a 10 bandas coloreadas, de las cuales 8 están teñidas de azul y dos (25 y 75 KDa) están teñidas en rojo. Se emplean 5 μ L de marcadores por pocillo a los que se añade tampón de muestra desnaturizante pero, en este caso, no es necesario calentar.

Preparación de los geles de poliacrilamida:

En primer lugar, se montan los cristales del sistema Mini-Protean 3 utilizando espaciadores de 0.75 mm. A continuación, se prepara la disolución del **gel separador**. Para preparar dos geles al 12.5% (p/v) de acrilamida se adicionan los siguientes componentes en las cantidades indicadas:

Componente	Cantidad
Agua destilada	3.2 mL
TRIS-HCl 1.5M, pH 8.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida 29%-bisacrilamida 1%	4.15 mL
Persulfato amónico 10% (p/v)	50 µL
TEMED	10 µL

La disolución se agita y se vierte en el espacio que queda entre los cristales dejando sin cubrir una distancia de unos 2 cm en el extremo superior del cristal de menor tamaño. Este espacio se cubre con agua para evitar que el gel entre en contacto con el O₂ del aire puesto que éste dificulta la polimerización. Se deja polimerizar durante 35-40 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se prepara el **gel concentrador** a una concentración de 4% de acrilamida. Para preparar dos geles se adicionan los siguientes componentes en las cantidades indicadas:

Componente	Cantidad
Agua destilada	6.1 mL
TRIS-HCl 0.5M, pH 6.8	2.5 mL
SDS 10%	100 µL
Acrilamida 29%-bisacrilamida 1%	1.3 mL
Persulfato amónico 10% (p/v)	50 µL
TEMED	10 µL

Una vez preparada la disolución del gel, se retira la capa de agua que cubría el gel separador y se vierte la mezcla entre los cristales hasta el borde de los mismos. Se introduce el peine en la parte superior para formar los pocillos, tratando de evitar la formación de burbujas. Se deja polimerizar entre 35-40 minutos a temperatura ambiente.

Electroforesis

En primer lugar, se prepara el tampón de recorrido. Para una cubeta con dos geles es suficiente con 400 mL de este tampón, cuya composición es TRIS-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% y tiene un pH de 8.3. Una vez que ha polimerizado el gel, se retira el peine y se lavan los pocillos con agua destilada. Se colocan los cristales con los geles en un soporte que lleva los electrodos en su parte superior y, este soporte se introduce en un marco de sujeción. Este conjunto constituye la cámara interna y se introduce, a su vez, en la cubeta de electroforesis. El espacio entre esta cámara interna y la cubeta constituye la cámara externa (Figura 3.18).

Una vez montado el sistema se vierte el tampón de recorrido en la cámara interna hasta cubrirla por completo y el exceso de tampón se vierte en la cámara externa. Se debe comprobar que ambas cámaras están incomunicadas para que no haya pérdidas de tampón desde la cámara interna a la externa durante la electroforesis. A continuación, se cargan los marcadores y las muestras en los pocillos de los geles utilizando una micropipeta con puntas capilares. El volumen máximo de muestra por pocillo en estos sistemas con geles finos es de unos 25-30 μ L. Por último se tapa la cubeta y se conecta a la fuente de tensión. La electroforesis se realiza a 180 V a temperatura ambiente. El avance del frente de electroforesis se puede seguir por el desplazamiento del azul de bromofenol que forma una fina banda horizontal. La separación de los marcadores coloreados nos permitirá seguir el grado de separación entre las proteínas de diferente peso molecular. La electroforesis se detiene cuando el azul de bromofenol se encuentra a 2-3 mm del extremo inferior del gel. Una vez finalizada la electroforesis, se desmonta el sistema y se extraen los geles de los cristales. Se retira el gel concentrador (que no contiene proteínas) y se realiza una muesca debajo de la primera calle para saber en todo momento cual es la orientación de las muestras en el gel.

3.3.2. WESTERN BLOT

El *Western Blot* es una técnica analítica utilizada para detectar proteínas de una muestra en la que hay una mezcla compleja de proteínas, como puede ser un extracto celular o tisular. En primer lugar las proteínas son separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y, posteriormente, se transfieren a una membrana (generalmente de nitrocelulosa o de PVDF) mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel. Una vez que las proteínas se han transferido a la membrana, se detecta la proteína de interés con anticuerpos específicos frente a ella.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se empleó un método de inmunodetección indirecto que utiliza, en primer lugar, un anticuerpo primario dirigido específicamente frente a la proteína de interés y, en segundo lugar, utiliza un anticuerpo secundario unido covalente a una molécula indicadora o *reporter* que puede ser una enzima (generalmente fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano), un átomo radioactivo o un fluorocromo. Este anticuerpo secundario reconoce al anticuerpo primario y permite detectar la unión antígeno-anticuerpo bien por la actividad enzimática sobre un sustrato cuyo producto es coloreado o quimioluminiscente, o bien por la emisión de radiactividad o fluorescencia. En nuestro caso, se utilizaron principalmente anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano, aunque en determinados experimentos se utilizaron anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos.

Mediante esta técnica se puede estudiar la presencia de una proteína en una muestra y comparar sus niveles en distintas condiciones (tratamiento con diversos compuestos, silenciamiento génico, etc.). Para poder comparar los niveles de una proteína determinada en distintas muestras es necesario normalizar utilizando una proteína de referencia indicadora de la cantidad de proteína presente en dichas muestras. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se empleó como proteína de referencia la β -actina, puesto que se trata de una proteína de expresión constitutiva cuyos niveles permanecen constantes, independientemente de las condiciones celulares. De esta manera, el nivel de una determinada proteína en una muestra se calculó como la cantidad relativa de dicha proteína respecto de la cantidad de β -actina.

Procedimiento:

El procedimiento de *Western Blot* consta de 5 etapas:

Inmovilización de proteínas sobre la membrana mediante electrotransferencia:

Mediante este proceso, las proteínas que han sido separadas mediante electroforesis en gel se transfieren a una membrana adsorbente donde podrán ser detectadas con anticuerpos. Para ello, se coloca el gel junto a la membrana en presencia de un tampón de transferencia y se aplica un campo eléctrico perpendicular al plano del gel que provocará la migración de las proteínas desde el gel hasta la membrana. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizaron membranas de nitrocelulosa con un diámetro de poro de 0.2 μm .

En primer lugar se prepara el tampón de transferencia (TT) (metanol 10%, glicina 192 mM, SDS 0.01%, TRIS-HCl 25 mM, pH 8.3). Una vez que ha finalizado la electroforesis, se sumerge el gel durante 10 minutos en TT para que se adapte a las condiciones de transferencia, dado que el metanol provoca una pequeña contracción del gel. Se corta la membrana de nitrocelulosa con un tamaño ligeramente superior al del gel, se incuba unos 5-10 minutos en agua para hidratarla y otros 5 minutos en TT. El sistema de transferencia utilizado fue el *Mini Trans Blot Cell* (Bio-Rad Laboratories) para *Western Blot*. Este sistema presenta un casete de plástico en el que se apilan los siguientes elementos sumergidos en TT: esponja, papel de filtro, gel, membrana, papel de filtro y esponja. Tanto las esponjas como el papel de filtro deben estar empapados de TT. Se recomienda pasar un rodillo tras incorporar cada uno de estos elementos al casete para evitar que queden burbujas de aire. El casete presenta una placa negra y otra transparente. Los elementos se deben apilar en el orden indicado sobre la placa negra, de manera que el gel quede orientado hacia esta placa y la membrana quede orientada hacia la placa transparente. Una vez montado el casete, se dispone en el sistema de transferencia de manera que la placa negra (próxima al gel) quede orientada hacia el cátodo y la placa transparente (próxima a la membrana) quede orientada hacia el ánodo. La transferencia se realiza utilizando una fuente de tensión a 100V durante 1 hora a 4°C con agitación. Al ser sometidas a un campo eléctrico, las proteínas del gel se desplazan hacia el polo positivo (ánodo) y quedan atrapadas en la membrana (Figura 3.19).

Una vez finalizada la transferencia, se desmonta el sistema y se abre el casete con la placa de color negro hacia arriba, de manera que, al retirar la esponja y el papel, aparece el gel sobre la membrana. Recortamos la membrana con la silueta del gel realizando una marca debajo de la primera calle para señalar la posición de las muestras.

Para comprobar que la transferencia ha sido correcta se pueden teñir las proteínas unidas a la membrana con rojo Ponceau. Para ello, se sumerge la membrana en una disolución de tinte (Ponceau-S 0.1% en ácido acético 1%) durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se retira la disolución de rojo Ponceau y se lava la membrana con agua destilada hasta observar bandas discretas teñidas de rojo. Finalmente, se elimina el colorante lavando la membrana con abundante agua destilada. Se trata de una tinción reversible, por lo que no interfiere con la posterior unión de los anticuerpos ni con el revelado de la actividad peroxidasa.

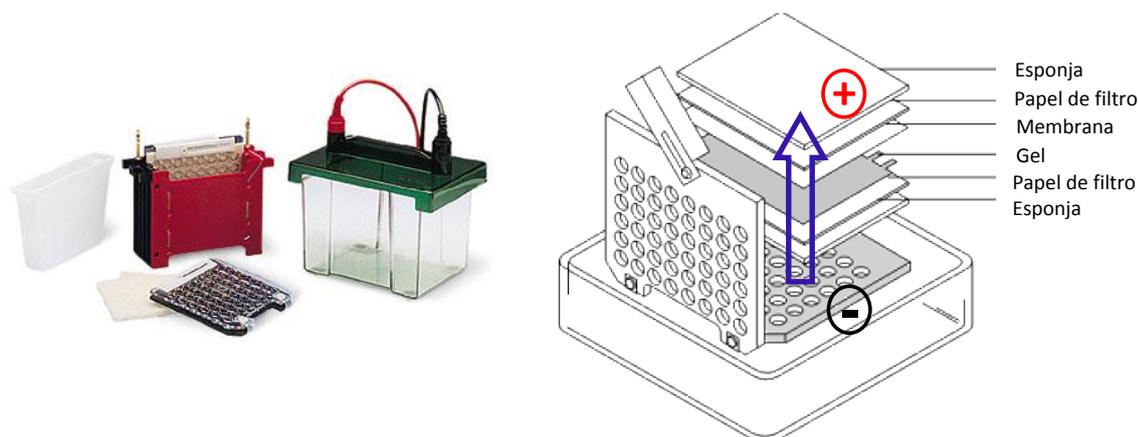


Figura 3.19. Sistema *Mini Trans Blot Cell* utilizado para la transferencia de las proteínas del gel a la membrana (panel izquierdo). Esquema del ensamblaje del casete de transferencia teniendo en cuenta la dirección de migración (panel derecho).

Bloqueo de las uniones inespecíficas

El proceso de bloqueo consiste en la saturación de todos los lugares de unión a proteínas de la membrana que no han sido ocupados por las proteínas transferidas, con el objetivo de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. Para ello, se incuba la membrana durante 1-2 horas con una disolución de bloqueo a temperatura ambiente y con agitación suave. Las disoluciones de bloqueo más utilizadas durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral fueron: leche desnatada en polvo al 5% en TBS-T (TRIS-HCl 10 mM, NaCl 30 mM, Tween-20 al 0.1%, pH 7.5) y BSA al 3% en TBS-T. En la práctica, se introduce la membrana en una bolsa de plástico que se rellena con la disolución de bloqueo (evitando la formación de burbujas) y se sella por calor. Las etapas posteriores de incubación con los anticuerpos también se realizan introduciendo la membrana en una bolsa. De esta manera, se reduce tanto el volumen de la disolución de bloqueo como la cantidad de anticuerpo utilizado. Tras el bloqueo, la membrana se lava con TBS-T durante 15 minutos. Los lavados se realizan en una bandeja con abundante tampón, a temperatura ambiente y con agitación.

Incubación con el anticuerpo primario

Se incuba la membrana con el anticuerpo primario a la concentración adecuada en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% o de BSA al 3% en TBS-T (en función de la disolución de bloqueo utilizada). Esta incubación puede realizarse a 4°C durante toda la noche o bien durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave.

Incubación con el anticuerpo secundario

Se retira el anticuerpo primario y se lava la membrana con TBS-T durante 15 minutos, cambiando el tampón cada 5 minutos. A continuación, se incuba durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a la concentración adecuada en una disolución de leche desnatada en polvo al 5% o de BSA al 3% en TBS-T.

Revelado de la actividad peroxidasa

Tras retirar el anticuerpo secundario, la membrana se lava con TBS-T durante 15 minutos, cambiando el tampón cada 5 minutos y se revela por medio de una técnica quimioluminiscente. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizó el kit *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare). Este método se basa en la oxidación del luminol por parte de la peroxidasa unida al anticuerpo secundario para generar ésteres de acridinio que emiten una luz intensa y de larga duración, con un máximo de emisión a 425 nm. El kit consta de dos reactivos que, una vez atemperados se mezclan en proporción 1:1. Se debe preparar un volumen suficiente para cubrir por capilaridad toda la superficie de la membrana. La membrana se incuba con la mezcla de detección durante 5 minutos a temperatura ambiente aunque, dependiendo de la cantidad de proteína presente en la muestra, el tiempo de incubación necesario puede ser mayor o menor. Pasado este tiempo, se retira la mezcla y se revela por medio del *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad Laboratories) que permite la captación de imágenes de una reacción quimioluminiscente y proporciona una información cuantitativa (Figura 3.20).

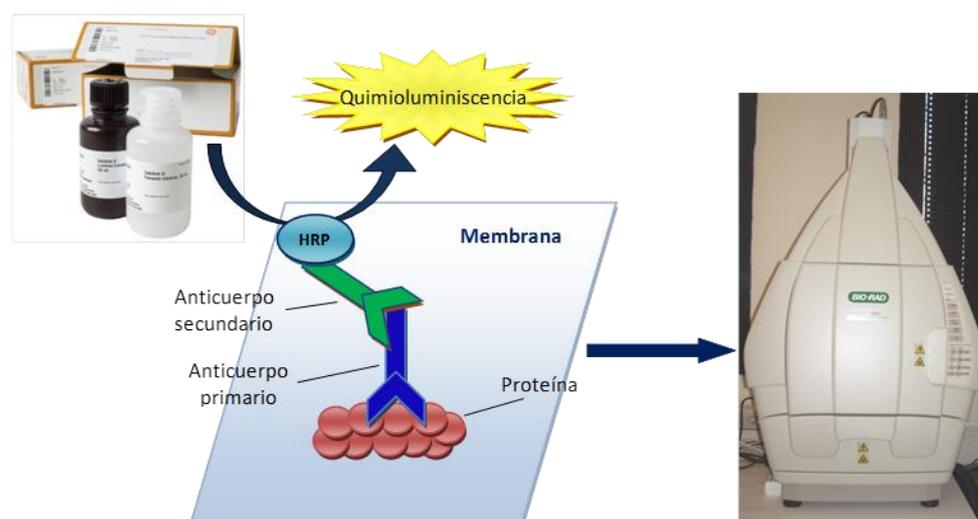


Figura 3.20. Esquema del proceso de revelado de la membrana utilizando el *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent*. A la derecha se muestra el *Molecular Imager ChemiDoc XRS+* utilizado para la captación de la imagen quimioluminiscente resultante.

3.3.3. CENTRIFUGACIÓN

La centrifugación es una técnica que se utiliza para separar partículas sólidas suspendidas en un medio líquido aprovechando su diferente velocidad de desplazamiento al ser sometidas a una fuerza centrífuga.

La fuerza centrífuga es la que se ejerce sobre un cuerpo cuando éste gira alrededor de un eje y su magnitud es directamente proporcional a la masa del cuerpo (m), al radio de giro (r) y a la velocidad de giro o angular (ω). Esta fuerza es perpendicular al eje de giro, tiende a alejar el cuerpo del mismo y viene determinada por la siguiente expresión:

$$F_{cf} = -m \times \omega^2 \times r$$

La fuerza centrífuga, F_{cf} , se expresa en Newtons ($Kg \times m \times s^{-2}$) en el Sistema Internacional.

La fuerza centrífuga puede acelerar el proceso de sedimentación de partículas que tienen tendencia a hacerlo espontáneamente (densidad superior a la del líquido), o de aquellas que tienden a flotar (densidad inferior a la del líquido). En este sentido, la tecnología actual permite llegar a fuerzas de centenares de miles de veces la fuerza de la gravedad.

Los aparatos utilizados para la generación de esta fuerza centrífuga reciben el nombre de centrífugas. En función de los márgenes de aceleración podemos distinguir dos tipos: centrífugas propiamente dichas (desde pocas rpm hasta 18 000 rpm aproximadamente) y ultracentrífugas (hasta 100 000 rpm). Una parte fundamental de las centrífugas es el rotor que es el dispositivo que gira y en el que se colocan los tubos. Los rotores pueden ser de dos tipos: angulares (rotores macizos en los que los tubos se colocan en unos orificios que forman un ángulo fijo respecto al eje de giro) y basculantes (rotores en los que los tubos se colocan en unas cestillas que, al girar, se disponen perpendicularmente al eje de giro). En general, en las centrífugas se suele controlar la temperatura de la cámara para evitar el sobrecalentamiento de las muestras debido a la fricción. Además, en el caso de las ultracentrífugas, debido a la elevada velocidad es necesario hacer un intenso vacío para evitar el calentamiento tanto de las muestras como del rotor. Las centrífugas más utilizadas durante la realización de esta Tesis Doctoral se muestran en la figura 3.21.



Figura 3.21. (A) Centrífuga Heraeus Multifuge 1L-R, utilizada para la sedimentación de células y de placas de ensayo tipo ELISA. (B) Microfuga Hettich mikro 120, utilizada para la obtención de pellets de células, la extracción de ácidos nucleicos y la inmunoprecipitación de proteínas. (C) Ultracentrífuga Beckman XL-90, utilizada para la centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa para la purificación de melanosomas.

En la práctica, las condiciones de centrifugación pueden expresarse haciendo referencia a dos parámetros diferentes: la velocidad de giro, expresada en revoluciones por minuto (rpm) y la fuerza centrífuga relativa (RCF), también conocida como g , que indica el número de veces que esta fuerza es superior al valor la fuerza de la gravedad. La conversión entre estos dos parámetros viene dada por la siguiente ecuación:

$$g = (1.118 \times 10^{-5}) \times r \times rpm^2$$

Donde g es la fuerza centrífuga relativa, r es el radio del rotor y rpm hace referencia a la velocidad de giro expresada en revoluciones por minuto.

La centrifugación se puede llevar a cabo con una finalidad preparativa o analítica. La primera se utiliza para aislar partículas para su aprovechamiento posterior y la segunda permite determinar propiedades físicas como la velocidad de sedimentación o el peso molecular. La centrifugación preparativa se utiliza para separar partículas según su velocidad de sedimentación (centrifugación diferencial), su masa (centrifugación zonal) o su densidad (centrifugación isopícnic). La centrifugación zonal y la centrifugación isopícnic constituyen ejemplos de centrifugación mediante un gradiente de densidad. En el primer caso se obtiene un líquido sobrenadante y un material sedimentado. En los otros dos casos las partículas se distribuyen en fracciones de diferentes densidades de un fluido líquido (centrifugación mediante un gradiente de densidad).

3.3.3.1. Centrifugación diferencial

La centrifugación diferencial se basa en la existencia de diferentes partículas en la suspensión cuya densidad difiere de la del medio. Como resultado de este tipo de centrifugación se obtiene un líquido sobrenadante y un material sedimentado. Si se centrifuga en condiciones suaves (poco tiempo, poca fuerza de aceleración) sedimentarán las partículas mayores y/o más densas. Cuando el sobrenadante de la primera centrifugación se centrifuga de nuevo en condiciones de más tiempo y más fuerza de aceleración, sedimentarán de nuevo las partículas más densas presentes, y así sucesivamente. Se pueden aplicar condiciones crecientes de severidad en la centrifugación y obtener una colección de sedimentos que corresponden sucesivamente a fracciones de partículas de diferente tamaño y/o densidad (Figura 3.22).

Durante la realización de este trabajo se utilizó la centrifugación diferencial de forma rutinaria para la sedimentación de células durante el subcultivo y durante los ensayos, bajo las condiciones apropiadas para cada tipo celular. Además, se recurrió a esta técnica para la obtención de una fracción vesicular rica en melanosomas a partir de homogenados celulares.

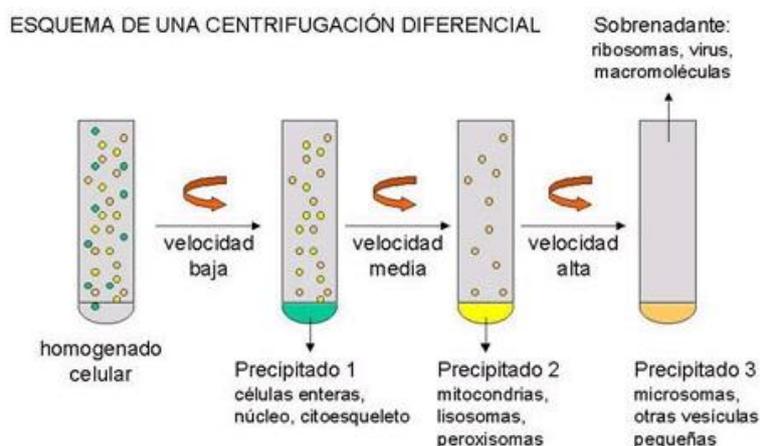


Figura 3.22. Esquema general del proceso de centrifugación diferencial.

3.3.3.2. Centrifugación en gradiente de densidad

Este tipo de centrifugación es un proceso mediante el cual las partículas se distribuyen en fracciones de diferente densidad de un fluido líquido. El método es un poco más elaborado que la centrifugación diferencial, pero presenta ventajas que compensan el trabajo añadido. La técnica permite la separación de varios o todos los componentes de la muestra y la realización de medidas analíticas. El método de gradiente de densidades implica la utilización de un soporte fluido cuya densidad aumenta desde la zona superior a la inferior. El gradiente se consigue con un soluto, preferiblemente de baja masa molecular, de tal manera que la muestra a analizar pueda ser suspendida en la solución resultante. Como solutos se utilizan la sacarosa, polisacáridos sintéticos, derivados yodados del ácido benzoico, o sales de metales alcalinos pesados como el rubidio o el cesio, entre otros. La muestra se deposita en la parte superior o inferior del gradiente como una fina banda y, tras centrifugar, la separación de los componentes de la muestra se presenta como diferentes bandas o zonas que pueden ser separadas o fraccionadas (Figura 3.23).

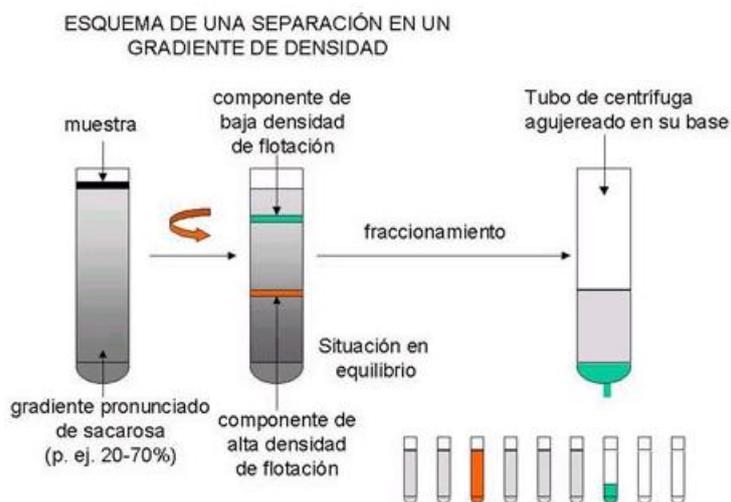


Figura 3.23. Esquema general del proceso de centrifugación en gradiente de densidad.

Hay dos variantes de este método, la centrifugación zonal y la centrifugación isopícnica:

Centrifugación zonal

En la centrifugación zonal la muestra a analizar se deposita en la parte superior de un gradiente de densidad previamente formado. A causa de la fuerza centrífuga las partículas se mueven a velocidades que dependen de la masa y sedimentan en diferentes zonas del gradiente. La densidad máxima del gradiente no ha de exceder a la de las partículas a separar.

Centrifugación isopícnica

La centrifugación isopícnica separa las partículas en un gradiente de densidades en función de la densidad de las mismas. Las partículas se mueven en el gradiente hasta que llegan a un punto donde la densidad de éstas y la del gradiente son idénticas (de aquí la denominación de "isopícnica"). En este caso, la densidad máxima del gradiente final ha de exceder siempre a la densidad de las partículas. Por este motivo, la sedimentación final no se produce si se controlan las condiciones de

centrifugación, ya que las partículas flotan sobre un "colchón" de material que posee una densidad superior a la de éstas. Esta técnica se utiliza, por ejemplo, para separar partículas similares en tamaño pero de diferente densidad. En este sentido, la centrifugación isopícnica es un método adecuado para separar ácidos nucleicos o diferentes orgánulos celulares.

Procedimiento:

A continuación se describe el procedimiento empleado para el aislamiento de núcleos celulares mediante centrifugación diferencial, así como el procedimiento utilizado para la purificación de los melanosomas mediante centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa a partir de fracciones celulares ricas en vesículas obtenidas previamente por centrifugación diferencial.

Aislamiento de núcleos mediante fraccionamiento celular

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se estudió el efecto del tratamiento con MTX sobre la presencia de la enzima metionina sintasa en el núcleo de las células de melanoma. Para ello, en primer lugar, se sembraron las células en frascos de 75 cm² y se sometieron al tratamiento con MTX a la concentración y tiempo requeridos. Transcurrido el tiempo de incubación, las células se recogieron con tripsina 0.25% y EDTA 0.25 mM, se contaron, se pasaron a un tubo eppendorf y se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos. A continuación, se realizó un lavado para eliminar los restos de medio de cultivo, para lo cual se resuspendió el pellet de células en 1 mL de sacarosa 0.25 M (en agua), se centrifugó a 1 000xg durante 5 minutos a 4°C, y se retiró el sobrenadante. El pellet de células se volvió a resuspender en 1 mL de sacarosa 0.25 M (en agua) y esta suspensión celular se sometió a homogenización suave mediante 20 golpes utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem sumergido en hielo. La suspensión resultante se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó a 800xg durante 10 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos. El sobrenadante (correspondiente a la fracción post-nuclear) se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, mientras que el pellet (correspondiente a la fracción nuclear) se resuspendió en 500 µL de sacarosa 0.25 M en HEPES 10 mM (pH 7) enfriada en hielo. Por último, tanto la fracción post-nuclear (sobrenadante) como la fracción nuclear fueron sometidas a sonicación intensa en presencia de inhibidores de proteasa. Estos extractos fueron utilizados para la detección de proteínas en cada una de las fracciones mediante inmunoprecipitación tal y como se detalla en el apartado 3.3.6 de este capítulo.

Purificación de melanosomas

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se estudió el efecto del tratamiento de las células de melanoma con distintos compuestos sobre la cantidad de melanosomas, su tamaño y su contenido en melanina, en comparación con células control. Para ello, se sembraron las células en frascos de cultivo y se sometieron a los tratamientos con los agentes correspondientes a la concentración y el tiempo deseados. Estas células se recogieron mediante tripsinización, se contaron, se pasaron a un tubo eppendorf en 1 mL de medio de cultivo y se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos. Estas muestras fueron congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización. Para estos experimentos se utilizó un mínimo de 1×10^7 células por cada muestra para obtener una fracción vesicular lo suficientemente abundante.

A partir de estas muestras, se purificaron los melanosomas mediante un proceso en dos etapas: el fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial para la obtención de una fracción

vesicular rica en melanosomas, y el aislamiento de los melanosomas presentes en dicha fracción vesicular mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.

a) Fraccionamiento subcelular por centrifugación diferencial:

En primer lugar, se descongelaron las muestras, se centrifugaron a 200xg durante 10 minutos y se retiró el medio de cultivo. A continuación, se realizó un lavado para eliminar los restos de medio de cultivo, para lo cual se resuspendió el pellet de células en 1 mL de sacarosa 0.25 M (en agua), se centrifugó a 700xg durante 5 minutos a 4°C, y se retiró el sobrenadante. El pellet de células se volvió a resuspender en 1 mL de sacarosa 0.25 M (en agua) y esta suspensión celular se sometió a homogenización suave mediante 20 golpes utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem sumergido en hielo. La suspensión resultante se transfirió a un tubo eppendorf y se sometió a centrifugación diferencial mediante la cual se fueron obteniendo los distintos componentes celulares de forma secuencial. Esta suspensión se centrifugó a 700xg durante 10 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos, restos membranosos y células no homogenizadas. El sobrenadante de esta centrifugación se transfirió a otro tubo eppendorf y se centrifugó a 16 000xg durante 30 minutos a 4°C. Como resultado de esta centrifugación se obtuvo un sobrenadante, correspondiente a la fracción citosólica, y un sedimento, correspondiente a la fracción vesicular rica en melanosomas. Esta fracción fue utilizada para estudios ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión, tal y como se describe en el apartado 3.2.4.2 de este capítulo.

b) Aislamiento de melanosomas por centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa:

Para la separación de los melanosomas de otras vesículas de tamaño similar, presentes en la fracción vesicular obtenida por el procedimiento anterior, se sometió esta fracción a centrifugación en gradiente discontinuo de densidad de sacarosa. Para ello, en primer lugar, se resuspendió el pellet correspondiente a la fracción vesicular en 1.6 mL de sacarosa 2 M (en HEPES 10 mM, pH 7). A continuación, se preparó el gradiente discontinuo de sacarosa en un tubo *Ultraclear* para lo cual, en la base de este tubo, se depositaron 1.6 mL de la fracción de vesículas resuspendidas en sacarosa 2 M y, sobre esta fracción, se fueron depositando cuidadosamente capas de 1.6 mL de sacarosa de concentraciones: 1.8 M, 1.6 M, 1.5 M, 1.4 M, 1.2 M y 1 M (en HEPES 10 mM, pH 7) desde la base del tubo hacia arriba. Una vez preparado el gradiente, se centrifugó a 28 500 rpm (100 000xg) durante una hora a 4°C en una ultracentrífuga. El peso de los tubos se ajustó hasta el tercer decimal por parejas utilizando sacarosa 1 M utilizando la balanza de precisión. Tras esta separación en gradiente de densidad, los melanosomas formaron una banda localizada, aproximadamente, a la altura de la fracción de sacarosa 1.2 M. Este procedimiento se utilizó para estudiar el efecto de diversos compuestos sobre la exportación de melanosomas al exterior celular. De esta manera, al tratar las células de melanoma con compuestos que aceleraban la expulsión de melanosomas desaparecía la banda correspondiente a estos melanosomas, mientras que al tratar las células con combinaciones de compuestos que bloqueaban esta expulsión de melanosomas se mantenía de esta banda.

3.3.4. LIOFILIZACIÓN

La liofilización es una técnica que consiste en eliminar el agua a una sustancia congelada sin pasar por el estado líquido. La solución acuosa que se quiere liofilizar se congela a -80°C y, a esa baja temperatura que impide que se produzcan cambios químicos que puedan deteriorarla, se somete a

un alto vacío que hace pasar el agua de estado sólido a estado gaseoso, sin pasar por el estado líquido. Es una forma de secar un producto químico a temperaturas bajísimas, sin el deterioro que produciría el calentamiento. Durante la realización de este trabajo, el proceso de liofilización fue llevado a cabo utilizando un liofilizador Virtis Advantage 2.0 ES (Figura 3.24).



Figura 3.24. Liofilizador Virtis Advantage 2.0 ES.

3.3.5. DETERMINACIÓN DE FÓLICO TOTAL

Para la determinación de fólico total se utilizó el kit *ID-Vit Folic acid* (Leti Diagnósticos), que se basa en un ensayo microbiológico que mide el contenido total de ácido fólico en una muestra. Para ello, las muestras se adicionan a una placa de cultivo que contiene *Lactobacillus rhamnosus*, el cual metaboliza todas las formas de fólico que éstas contienen, de forma que se obtiene un crecimiento de los microorganismos dependiente de la concentración inicial de fólico. La medida espectrofotométrica de la placa proporciona una medida del crecimiento que es proporcional a la cantidad total de fólico. La bacteria *L. rhamnosus* es capaz de metabolizar todas las formas de fólico, sin embargo, no puede hacerlo con las especies que están poliglutaminadas. Por este motivo, para determinar la cantidad total de folatos, es necesario realizar previamente un paso de desglutaminación mediante el tratamiento con conjugasa de plasma de rata, que permite convertir todas las especies poliglutaminadas a la forma metabolizable por el microorganismo, por lo que se puede evaluar la cantidad total de folatos sea cual sea su estado de poliglutaminación inicial.

Procedimiento:

Aislamiento de la conjugasa de plasma de rata:

Se extrajo la sangre de una rata mediante punción cardiaca e inmediatamente se aisló el plasma centrifugando las muestras a 4°C (1 500xg, 10 minutos). Posteriormente, se eliminaron los folatos endógenos incubando las muestras de plasma con Charcoal (carbón activo) en agitación y en hielo durante 1 hora. Por último, se filtraron a través de un filtro de 0.22 µm y las alícuotas se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Determinación de fólico total:

Se sembraron las células en frascos de cultivo de 75 cm² y se sometieron al tratamiento con los compuestos que se deseaba probar a la concentración y tiempo correspondientes. Se recogieron las células mediante tripsinización y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación, se lisaron las células mediante incubación en un tampón que contenía fosfato 100 mM, ácido ascórbico 2% y β-

mercaptoetanol 2% (pH 6). Posteriormente, los lisados se pasaron varias veces a través de la aguja de una jeringa y se calentaron a 96°C durante 5 minutos. Se centrifugaron a 14 000xg durante 5 minutos y se recogieron los sobrenadantes. Para desglutaminar las muestras con la conjugasa de plasma de rata, se incubaron 125 µL de los sobrenadantes de las muestras con 275 µL de conjugasa y 100 µL de tampón fosfato 100 mM que contenía ácido ascórbico 1% (pH 6). La mezcla se incubó a 37°C protegida de la luz durante 2 horas. Posteriormente, las muestras se calentaron a 96°C durante 5 minutos y se centrifugaron a 14 000xg durante 5 minutos. Los sobrenadantes se esterilizaron pasándolos a través de un filtro de 0.22 µm. Se preparó el medio de cultivo y los estándares, y se realizaron diluciones de las muestras para que las medidas quedaran dentro de la recta de calibrado. Se preparó la placa de cultivo añadiendo a cada pocillo 150 µL de medio y 150 µL de los estándares o de las muestras diluidas. La placa se selló y se incubó en oscuridad a 37°C durante 48 horas. Finalmente, la placa se leyó en un lector de placas a 610-630 nm. Las medidas de los estándares de concentración conocida proporcionaron una recta de calibrado, que permitió obtener la concentración de fólculo total de las muestras, teniendo en cuenta el factor de dilución empleado.

3.3.6. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS

La inmunoprecipitación es una técnica que consiste en la precipitación de una proteína que se encuentra en solución utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente a dicha proteína. Este proceso se puede utilizar para aislar y concentrar una proteína en particular a partir de una muestra que contiene miles de proteínas diferentes.

Para poder llevar a cabo la inmunoprecipitación, se necesita unir el anticuerpo a un sustrato sólido que permita recuperar los complejos antígeno-anticuerpo. Como sustrato sólido se suelen utilizar microesferas magnéticas o de sefarosa recubiertas de proteína A o proteína G, que son proteínas bacterianas que se unen con una alta afinidad a la porción Fc de una gran variedad de inmunoglobulinas. La especificidad de estas proteínas para unirse a las inmunoglobulinas depende tanto de la especie utilizada para la obtención del anticuerpo como del isotipo de inmunoglobulina, por lo que se deberá elegir una proteína u otra en función del anticuerpo que se pretenda utilizar. En el caso de utilizar microesferas magnéticas recubiertas de proteína A o G, éstas se pueden recuperar fácilmente depositando las muestras en un soporte magnético, de manera que las microesferas quedan adheridas a la pared del tubo en contacto con el imán. En el caso de utilizar microesferas de sefarosa recubiertas de proteína A o G, éstas se pueden recuperar fácilmente por centrifugación gracias a que la sefarosa confiere un carácter insoluble a los complejos proteína G-sefarosa.

La inmunoprecipitación se puede llevar a cabo mediante un método directo o indirecto. En el **método directo**, en primer lugar se inmoviliza el anticuerpo sobre las microesferas, formando microesferas recubiertas de anticuerpo que se incuban después con la muestra para capturar la proteína de interés. En el **método indirecto**, en primer lugar se incuba el anticuerpo con la muestra para formar los complejos antígeno-anticuerpo y, estos complejos antígeno-anticuerpo preformados, serán inmovilizados después mediante su incubación con las microesferas. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se realizó inmunoprecipitación mediante el método indirecto para la precipitación de diversas proteínas de interés procedentes de lisados de células de cultivo sometidas a diversos tratamientos (Figura 3.25).

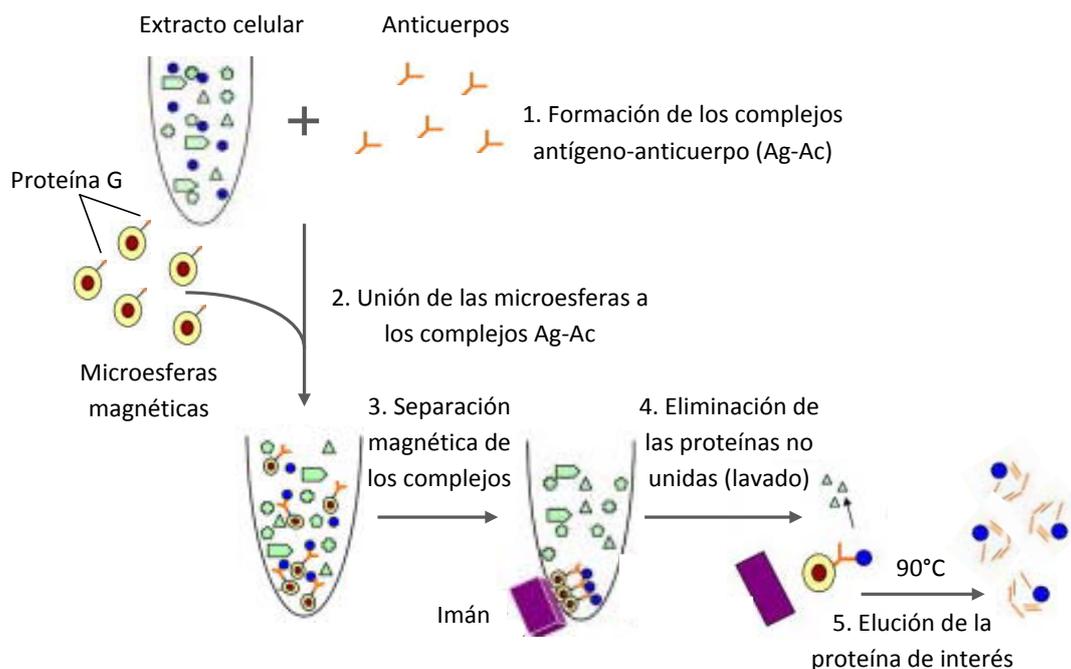


Figura 3.25. Esquema del proceso de inmunoprecipitación indirecta con microesferas magnéticas recubiertas de proteína G.

Procedimiento:

Para los ensayos de inmunoprecipitación, se sembraron las células en frascos de cultivo de 75 cm² y se sometieron a los tratamientos deseados. Las células se recogieron mediante tripsinización y se sedimentaron mediante centrifugación. Se retiró el medio de cultivo y el pellet se lavó dos veces con PBS centrifugando a 3 000 rpm durante 5 minutos para volver a sedimentar las células tras cada lavado. A continuación, se lisaron las células en 500 µL del tampón de lisis (TRIS 50 mM, NaCl 300 mM, NP40 0.4%, MgCl₂ 10 mM, pH 8.0), conteniendo inhibidores de proteasas e inhibidores de fosfatasa, durante 10-15 minutos en hielo. A continuación, se centrifugaron los extractos a 20 000xg durante 15 minutos y se diluyeron con 500 µL de tampón de dilución (TRIS 50 mM, CaCl₂ 2.5 mM, NP40 0.4%, pH 8.0) conteniendo inhibidores de proteasas, inhibidores de fosfatasa y DNasa I (1 mg/mL). Los extractos celulares se incubaron con el anticuerpo a la concentración indicada por el proveedor durante 1 hora a 4°C con agitación por rotación vertical para favorecer la formación de los complejos antígeno-anticuerpo.

Mientras tanto, se prepararon las microesferas magnéticas. Por cada muestra se tomaron 50 µL de la suspensión de microesferas y se colocaron en un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se colocaron los tubos en una gradilla magnética para sedimentar las microesferas y se retiró el tampón de almacenamiento. Se añadieron 500 µL de PBS conteniendo un 0.1% de Tween-20 a cada tubo y se agitó vigorosamente con el vórtex durante 10 segundos para lavar las bolas. Los tubos se volvieron a colocar en la gradilla magnética para sedimentar las bolas y se retiró el tampón de lavado.

Una vez finalizada la incubación de los extractos con el anticuerpo frente a la proteína de interés, se añadió esta suspensión (conteniendo los complejos antígeno-anticuerpo preformados) sobre las microesferas magnéticas que habíamos preparado anteriormente. Se incubó durante 20

minutos a temperatura ambiente con rotación vertical constante para que la proteína G que recubre las microesferas capturara los complejos antígeno-anticuerpo. Una vez finalizada la incubación, se sedimentaron las microesferas colocando los tubos en la gradilla magnética y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf con mucho cuidado para no arrastrar microesferas. Este sobrenadante constituyó la fracción no unida o *unbound* que se utilizó para determinar la cantidad de β -actina, como referencia de la cantidad de proteína que había en la muestra de partida. A continuación, los complejos antígeno-anticuerpo-microesfera se lavaron 3 veces con PBS conteniendo un 0.1% de Tween-20 para eliminar los restos de proteína no unida. Por último, se resuspendieron las microesferas en 60 μ L de tampón de muestra desnaturante (2X) y se calentaron a 70-90°C durante 10 minutos para romper las interacciones entre los anticuerpos y la proteína de interés y liberar esta proteína al medio. Por último, se colocaron los tubos en la gradilla magnética para sedimentar las microesferas y se transfirió el sobrenadante (conteniendo la proteína de interés libre en solución) a un nuevo tubo. Se añadió el mismo volumen de tampón de muestra desnaturante a la fracción no unida separada anteriormente. Las muestras así preparadas fueron utilizadas para electroforesis y *western blot* tal y como se describe en los apartados 3.3.1 y 3.3.2 de este capítulo, o bien fueron analizadas mediante espectrometría de masas como se describe en el siguiente apartado.

3.3.7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La Espectrometría de Masas es una técnica analítica esencial para estudios de proteómica debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares de proteínas. Los espectrómetros de masas utilizados para el análisis de proteínas poseen una fuente de ionización suave que genera e introduce los iones analitos en el instrumento para la detección posterior de sus masas. La técnica de ionización utilizada para este trabajo fue la ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI, acrónimo del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*). Para esta técnica, la muestra se deposita en una matriz sólida que se utiliza para proteger a la muestra y para facilitar la vaporización y la ionización. Posteriormente, se irradia con un láser pulsado y la energía del láser expulsa iones excitados de la matriz, que crean una densa nube de gas por encima de la superficie de la muestra.



Figura 3.26. Espectrofotómetro de masas MSD TOF de Agilent Technologies.

La muestra se ioniza por las colisiones y por complejación con pequeños cationes. Finalmente, los iones se detectan mediante un analizador de tiempo de vuelo (TOF, acrónimo del inglés *Time Of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa-carga tras ser acelerados en un campo eléctrico. El análisis de las muestras mediante espectrometría de masas se llevó a cabo en la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia en un espectrofotómetro de masas modelo MSD TOF (Agilent Technologies) con una fuente de ionización AP-MALDI (Agilent Technologies) acoplado a un láser de N₂ (Figura 3.26).

Procedimiento:

La obtención de las proteínas de interés para el análisis mediante espectrometría de masas se realizó mediante inmunoprecipitación a partir de lisados celulares control o procedentes de células sometidas a los tratamientos correspondientes. Esta inmunoprecipitación se llevó a cabo siguiendo el procedimiento indicado en el apartado 3.3.6 de este capítulo con dos variaciones. En primer lugar, los tampones de lisis y dilución contenían tricostatina 2.5 μM (inhibidor de la desacetilación) y trans-2-fenilciclo-propilamina 20 μM (inhibidor de la desmetilación). En segundo lugar, el anticuerpo se unió covalentemente a microesferas magnéticas *Dynabeads* (Invitrogen), para evitar que las muestras quedaran contaminadas con el anticuerpo tras el proceso de elución de la proteína de interés de los complejos antígeno-anticuerpo-microesfera.

Tras la inmunoprecipitación se realizó una digestión de la proteína de interés con tripsina (Shevchenko *et al.*, 1996). Esta enzima corta las proteínas en el extremo C-terminal de residuos de lisina y arginina, excepto cuando el siguiente residuo es una prolina. Las muestras digeridas se limpiaron mediante columnas *C18 ZipTips* (Millipore) y se evaporaron utilizando el concentrador a vacío Eppendorf modelo 5301.

Las muestras digeridas, se disolvieron en 5 μL de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% y se mezclaron con un volumen igual de una disolución saturada de la matriz, ácido α-ciano-4-hidroxicinámico en 0.1% de TFA en H₂O:acetonitrilo (1:1). Se aplicaron 2 μL de la mezcla de las muestras con la matriz en la placa del espectrofotómetro y se dejaron secar a temperatura ambiente para permitir que cristalizaran conjuntamente. Finalmente, se analizaron las muestras en el espectrómetro de masas, registrando medidas en modo positivo en el rango de 200-7 000 *m/z*. Los datos fueron adquiridos y procesados con el *Agilent MassHunter Workstation Software* para obtener la huella peptídica. Los espectros de masas fueron analizados para encontrar la secuencia de la proteína de interés con la modificación fija de la carbamidometilación de los residuos cisteína y las modificaciones variables de metilación y acetilación de los residuos lisina, oxidación de los residuos metionina y fosforilación de los residuos serina.

3.3.8. CROMATOGRAFÍA

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla en función de la influencia de dos efectos contrapuestos: la retención de los componentes de la mezcla por una fase estacionaria y el desplazamiento de estos componentes en una fase móvil. La mezcla a separar se deposita sobre la fase estacionaria, mientras que la fase móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distinta velocidad, dependiendo de la intensidad de sus interacciones con ambas fases.

Como consecuencia de esta distinta movilidad, se consigue separar los componentes de la mezcla en bandas o zonas discretas que pueden analizarse cualitativa y/o cuantitativamente. El fenómeno de migración de los componentes de la mezcla a lo largo de la fase estacionaria, impulsados por la fase móvil, recibe el nombre de elución. El tiempo que tarda un compuesto en ser eluido de la columna se denomina tiempo de retención y se considera una propiedad identificativa característica de un compuesto en una determinada fase móvil y estacionaria

Dependiendo del tipo de cromatografía, la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido, mientras que la fase móvil puede ser un líquido o un gas. Las dos fases se eligen de forma que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre la fase móvil y la fase estacionaria para lograr una separación óptima.

3.3.8.1. Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular, también denominada de filtración en gel o de tamiz molecular es una de las técnicas más utilizadas para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Este tipo de cromatografía se lleva a cabo en columnas cilíndricas rellenas con un gel (que constituye la fase estacionaria) que puede ser de varios tipos: dextranos con enlaces cruzados (sephadex), agarosa (sepharosa, Bio-gel A), poliacrilamida (Bio-gel B), etc. Estos geles están constituidos por partículas de un material esponjoso hidratado que presenta poros con un diámetro determinado. Cuando se hace pasar la mezcla de moléculas de distinto tamaño a través de una columna de filtración en gel, aquellas moléculas con un tamaño mayor que el de los poros de las partículas que constituyen el gel, se moverán a lo largo de la fase estacionaria a través de los espacios que quedan entre las partículas del gel. Sin embargo, aquellas moléculas capaces de penetrar en los poros de las partículas del gel se verán retrasadas por la fase estacionaria en mayor medida cuanto menor sea su tamaño. Por tanto, en este tipo de cromatografía, las moléculas eluyen por orden decreciente de tamaño molecular (Figura 3.27).

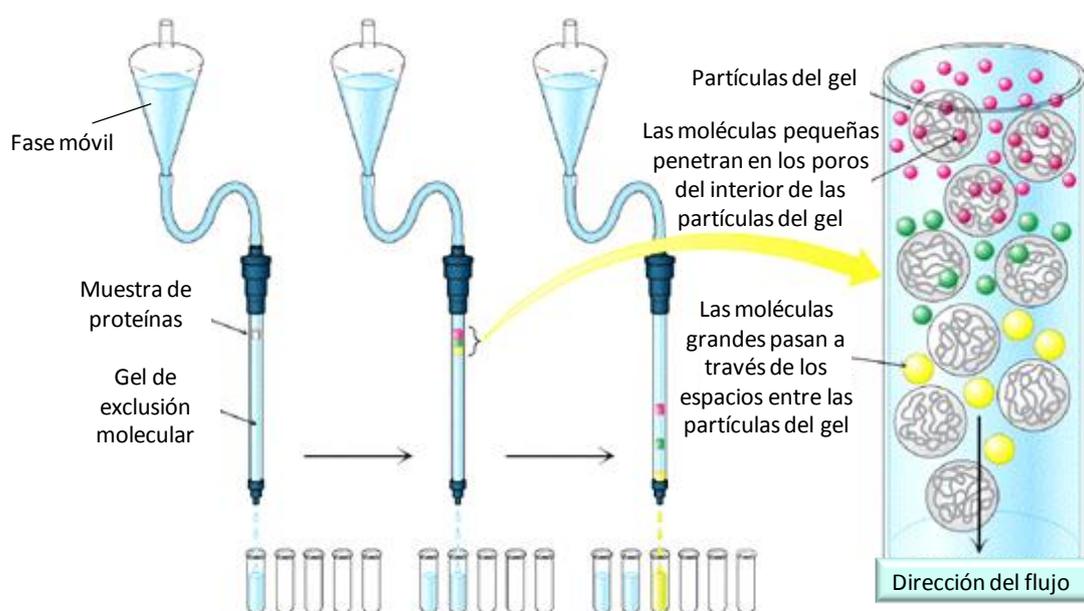


Figura 3.27. Esquema del proceso de cromatografía de exclusión molecular.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se recurrió a la técnica de cromatografía de exclusión molecular para separar MTX conjugado con peroxidasa de rábano picante de las moléculas de peroxidasa y de MTX libres tras el proceso de conjugación. Para ello, se utilizó una columna de Sephadex G-25 equilibrada con PBS (pH 7.4) tal y como se indica en el apartado 3.3.9 de esta memoria.

3.3.8.2. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC (acrónimo del inglés *high performance liquid chromatography*) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en los diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. En la HPLC el compuesto pasa por la columna cromatográfica a través de la fase estacionaria (normalmente, un cilindro con pequeñas partículas redondeadas con ciertas características químicas en su superficie) mediante el bombeo de líquido (fase móvil) a alta presión a través de la columna. La muestra a analizar es introducida en pequeñas cantidades y sus componentes se retrasan diferencialmente dependiendo de las interacciones químicas o físicas con la fase estacionaria a medida que avanzan por la columna. El grado de retención de los componentes de la muestra depende de la naturaleza del compuesto, de la composición de la fase estacionaria y de la fase móvil.

La utilización de presión en este tipo de cromatografías incrementa la velocidad lineal de los compuestos dentro de la columna y reduce su difusión dentro de la columna, mejorando la resolución de la cromatografía. Los disolventes más utilizados son el agua, el metanol y el acetonitrilo. El agua puede contener tampones, sales, o compuestos como el ácido trifluoroacético o el ácido fórmico, que ayudan a la separación de los compuestos.

Una mejora introducida a la técnica de HPLC descrita es la variación en la composición de la fase móvil durante el análisis, conocida como “elución en gradiente”. El gradiente utilizado varía en función de la hidrofobicidad del compuesto. El gradiente separa los componentes de la muestra como una función de la afinidad del compuesto por la fase móvil utilizada respecto a la afinidad por la fase estacionaria. Si se utiliza por ejemplo un gradiente agua/acetonitrilo los compuestos más hidrofílicos eluirán a mayor concentración de agua, mientras que los compuestos más hidrofóbicos eluirán a concentraciones elevadas de acetonitrilo. A menudo, hace falta realizar una serie de pruebas previas con el fin de optimizar el gradiente de forma que permita una buena separación de los compuestos.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se realizó HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC/MS) para la cuantificación de la concentración de DHF a partir de extractos de células tratadas con distintos compuestos. Para ello, los picos correspondientes al DHF se identificaron mediante la comparación de los tiempos de retención, los picos correspondientes a los iones moleculares y los fragmentos característicos de MS/MS con los de estándares de DHF puro. La concentración de DHF de las distintas muestras se calculó comparando el área de los picos correspondientes al DHF con el área de los picos de los estándares de concentración conocida de DHF. El análisis se realizó en un sistema HPLC/MS constituido por el HPLC Agilent 1100 Series (Agilent Technologies) conectado a un espectrómetro de masas Agilent Ion Trap XCT Plus (Agilent Technologies) situado en la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia. La interfaz entre el HPLC y el MS se estableció mediante una fuente de ionización por electrospray. El

espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo positivo. Para la cuantificación, se inyectaron 40 μL de cada muestra en una columna de HPLC Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent Technologies) termostata a 40°C, con un flujo de 200 $\mu\text{L}/\text{s}$. Para la elución en gradiente se utilizó una fase móvil A consistente en agua con ácido fórmico al 0.1% y una fase móvil B formada por acetonitrilo con ácido fórmico al 0.1%.

3.3.9. CONJUGACIÓN DE MTX CON PEROXIDASA

Con la finalidad de facilitar el análisis de los niveles de MTX en el interior de las células de melanoma sometidas a distintas combinaciones terapéuticas, se unió covalentemente esta droga a la enzima peroxidasa de rábano picante (*horseradish peroxidase isoenzyme C* o HRP). Para ello, en primer lugar, se incubó el MTX con EDC (N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida clorhidrato) que es un agente activador de grupos carboxilo que permite el posterior acople de aminas primarias para generar enlaces amida. En segundo lugar, se incubó este MTX activado con la enzima HRP, de manera que los residuos lisina de esta enzima reaccionaron con los grupos carboxilo activados del MTX, dando lugar a MTX conjugado con HRP.

Procedimiento:

En primer lugar se prepararon 1.5 mL de una disolución de MTX 10 mM en tampón fosfato 100 mM pH 7.0. Se tomó 1 mL de esta disolución y se añadió la cantidad correspondiente de EDC para obtener una concentración final de 20 mM de EDC en la disolución de MTX. Se incubó la mezcla durante 40 minutos a temperatura ambiente con agitación. A continuación, se añadió 1 mL de una disolución de HRP (10 μM , pH 7) lentamente sobre la disolución de MTX activado y esta mezcla se incubó durante 18 horas, a temperatura ambiente, con agitación y protegida de la luz para permitir la formación de los conjugados MTX-HRP. Los conjugados se separaron de los restos de MTX y HRP libres mediante cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna de Sephadex G-25 equilibrada con PBS (pH 7.4). Las fracciones correspondientes a la elución de los conjugados se reunieron en un mismo tubo y se congelaron a -80°C. La muestra congelada se sometió a liofilización durante toda la noche. El liofilizado se resuspendió en 1.5 mL de PBS (pH 7.4). La enzima HRP presenta un peso molecular de 40 kDa y contiene 6 residuos de lisina que pueden unirse potencialmente a MTX. El grado de conjugación de HRP con MTX se determinó espectrofotométricamente como la relación entre la concentración de MTX (obtenida a partir de la absorbancia de esta fracción a 280 nm, tras eliminar la absorbancia a esta longitud de onda debida a HRP) y la concentración de HRP (obtenida a partir de la absorbancia de esta fracción a 402 nm, tras eliminar la absorbancia a esta longitud de onda debida a MTX). Este MTX conjugado con HRP se utilizó para el tratamiento de células de melanoma SK-MEL-28 (sembradas en placas de 96 pocillos) a una concentración de 1 μM , en presencia y en ausencia de UCN-01 50 nM durante 4 horas. Una vez finalizada la incubación, las células fueron lavadas con abundante PBS (pH 7.2) frío hasta que el sobrenadante estuvo libre de actividad peroxidasa. La actividad peroxidasa presente en el interior de las células se reveló mediante la adición de un sustrato cromogénico de HRP, el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) o ABTS, a una concentración de 0.5 mM en PBS pH 7.2, conteniendo H_2O_2 0.1 mM. La oxidación del ABTS por HRP se siguió mediante la medida de la absorbancia a 414 nm utilizando un lector de placas SpectraMax 340PC384 (Molecular Devices, LLC). Los niveles relativos de MTX presente en cada muestra se estimaron a partir del índice de conjugación entre MTX y HRP.

3.3.10. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD PP2A

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) cataliza la eliminación de grupos fosfato unidos a aminoácidos serina o treonina de un amplio rango de fosfoproteínas. Esta serín-treonín fosfatasa tiene un papel esencial en el control de la homeostasis celular ya que regula procesos tan diversos como el metabolismo, la transcripción de genes, la progresión en el ciclo celular o el desarrollo embrionario, a través de la regulación negativa de muchas de las cascadas de señalización desencadenadas por quinasas. Puesto que muchos cánceres se caracterizan por la actividad aberrante de quinasas oncogénicas, la PP2A ha sido considerada como un potencial supresor tumoral. Esta proteína fosfatasa presenta una estructura trimérica que puede presentar varias formas, pero siempre consta de una subunidad catalítica (subunidad C), asociada a una subunidad reguladora (subunidad A). Este complejo se asocia además a una tercera subunidad variable (subunidad B), que confiere distintas propiedades al holoenzima. Puesto que diversos estudios han puesto de manifiesto que esta proteína es activada por metilación de su subunidad catalítica, durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral analizamos el efecto del tratamiento con MTX (que tiene un efecto desmetilante) sobre la actividad de esta proteína. Los ensayos de actividad PP2A se llevaron a cabo utilizando el Kit *PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay* (Upstate Biotechnology) que permite la detección de la actividad PP2A a partir de la medida del fosfato inorgánico liberado por la acción de la enzima sobre un fosfopéptido sintético (K-R-p-T-I-R-R). En este ensayo, la cantidad de fosfato libre se determina a partir de la reacción del fosfato inorgánico presente en la muestra con el reactivo Verde Malaquita para formar un compuesto de color verde que puede ser cuantificado espectrofotométricamente.

Procedimiento:

Elaboración de la recta de calibrado

En primer lugar se obtuvo la recta de calibrado mediante la preparación de una serie de disoluciones de concentración de fosfato creciente a partir de una disolución estándar de fosfato (0.1 mM) proporcionada por el proveedor. Se transfirieron 25 μL de cada una de estas disoluciones a pocillos de una placa de microtitulación proporcionada por el proveedor y se adicionaron 100 μL de la solución de verde malaquita a cada pocillo con cuidado de no formar burbujas. La placa se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo de color y se midió la absorbancia a 630 nm en un lector de placas utilizando agua Milli Q como blanco. Los volúmenes de fosfato estándar y de agua Milli Q, así como la cantidad de fosfato presente en 25 μL de disolución se detallan en la siguiente tabla:

Volumen (μL) fosfato estándar (0.1 mM)	0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200
Volumen (μL) de agua milli Q	250	230	210	190	170	150	130	110	90	70	50
pmoles de fosfato/ 25 μL de disolución	0	200	400	600	800	1000	1200	1400	1600	1800	2000

La recta patrón, obtenida de la representación de la absorbancia a 630 nm frente a los pmoles de fosfato, se muestra en la figura 3.28.

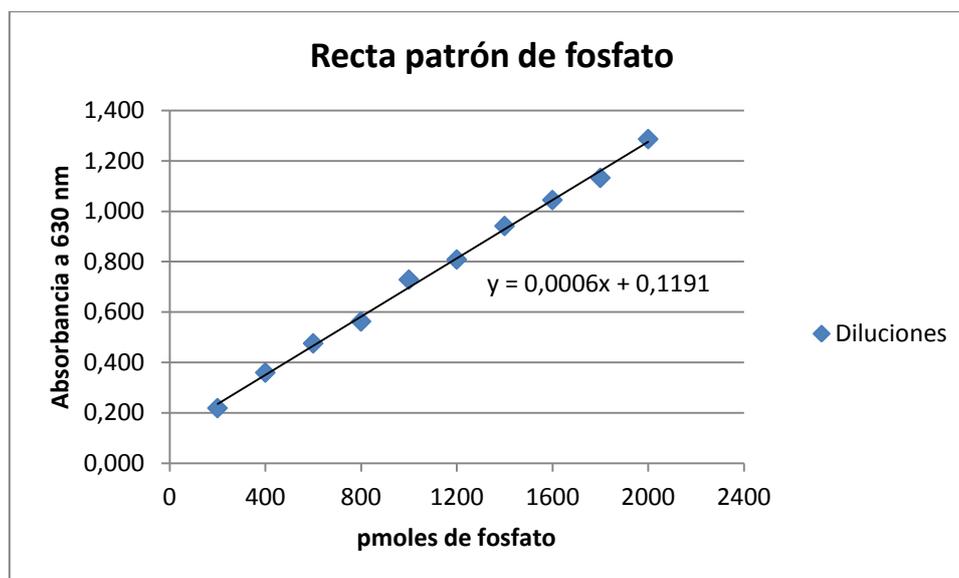


Figura 3.28. Recta patrón que relaciona la absorbancia a 630 nm con la cantidad de fosfato libre en la muestra.

Preparación de la solución de Verde Malaquita para la detección de fosfato

Para preparar la solución de Verde Malaquita para la detección de fosfato inorgánico, se añadieron 10 μL de disolución B por cada mililitro de disolución A del kit. Se requieren 100 μL de esta mezcla por cada pocillo de la placa de microtitulación. La solución de verde malaquita se puede mantener a temperatura ambiente durante su utilización, pero se debe preparar solamente la cantidad requerida para cada ensayo.

Preparación de los lisados celulares

Las células se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm^2 y se sometieron al tratamiento con MTX a las concentraciones y tiempos correspondientes en cada ensayo. Se retiró el medio de cultivo y las células se recogieron mediante raspado en 750 μL de tampón de extracción de fosfatasa (imidazol-HCl 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, pH 7.0, conteniendo 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de aprotinina, leupeptina, antipaina, inhibidor de tripsina de soja, benzamidina 1 mM y PMSF 1 mM). La suspensión celular resultante se sometió a sonicación mediante 4 pulsos on/off de 10 segundos en hielo. Los extractos se centrifugaron a 2 000xg durante 5 minutos a 4°C y los sobrenadantes fueron transferidos a un nuevo tubo eppendorf estéril y mantenidos en hielo hasta la realización del ensayo de actividad PP2A.

Ensayo enzimático de actividad PP2A

En primer lugar, se cuantificó la cantidad de proteína presente en cada muestra mediante la técnica de Bradford. A continuación, se realizó una inmunoprecipitación de la PP2A presente en las muestras. Para ello, se tomó, de cada muestra, el volumen correspondiente a 800 μg de proteína y se adicionaron 5 μL de anticuerpo frente a PP2A y 30 μL de suspensión de proteína A-agarosa. Además, se añadió a cada muestra el volumen correspondiente de *pNPP Ser/Thr Assay Buffer* (proporcionado

por el kit) hasta alcanzar un volumen final de 500 μL . Las muestras se incubaron durante 2 horas a 4°C con rotación vertical. Una vez finalizada la incubación, las muestras se lavaron 3 veces con 700 μL de TBS y una última vez con 500 μL de *pNPP Ser/Thr Assay Buffer*. Tras cada lavado, se sedimentaron las microesferas de agarosa mediante centrifugación a 1 200 rpm durante 5 minutos y se volvieron a resuspender de nuevo en tampón de lavado agitando con el vórtex. Por último, se adicionaron a cada muestra 60 μL de fosfopéptido y 20 μL de *pNPP Ser/Thr Assay Buffer* (ambos proporcionados por el kit) y se incubaron a 30°C durante 1 hora para permitir la actuación de la enzima PP2A presente en las muestras sobre el fosfopéptido para liberar fosfato inorgánico. Pasado este tiempo de incubación, se transfirieron 25 μL de cada muestra a pocillos de una placa de microtitulación y se adicionaron 100 μL de la solución de Verde Malaquita a cada pocillo con cuidado de no formar burbujas. Esta placa se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la reacción del fosfato libre presente en las muestras con el reactivo Verde Malaquita para dar un compuesto de color verde. Por último, se midió la absorbancia a 630 nm y se calculó la cantidad de fosfato presente en cada muestra mediante interpolación en la recta de calibrado. Tanto el tampón de extracción de fosfatasa, como el TBS se prepararon utilizando agua Milli-Q para evitar introducir fosfato exógeno en las muestras. Antes de realizar los ensayos, se comprobó que tanto el agua como los tampones y las muestras estaban libres de fosfato contaminante, mediante la adición de 100 μL de solución de Verde Malaquita a las correspondientes alícuotas de los mismos.

3.3.11. ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE

Se denomina espectrofotometría o espectroscopía de absorción a la medición de la cantidad de energía radiante que absorbe un sistema químico en función de la longitud de onda de la radiación incidente. En concreto, la espectrofotometría ultravioleta visible (UV/VIS) utiliza luz de las regiones visible, ultravioleta cercana e infrarroja cercana del espectro electromagnético, es decir, de una longitud de onda entre 200 y 800 nm. Dicha energía absorbida es empleada por los electrones externos (electrones de valencia) para excitarse a niveles de energía superiores, liberándose el exceso de energía en forma de calor.

Cuando un haz de radiación UV-VIS atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se emplea la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Lambert-Beer:

$$A = c \times \epsilon \times l$$

Donde ϵ es el coeficiente de extinción molar medido en $\text{M}^{-1}/\text{cm}^{-1}$, l es el paso óptico y c es la concentración del analito o especie absorbente. Esta ecuación permite determinar la concentración de una sustancia en disolución a partir de su absorbancia conociendo su coeficiente de extinción molar y el paso óptico de la cubeta empleada en la medida.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se empleó la espectrofotometría UV/VIS para la determinación de la concentración de los distintos compuestos en las disoluciones empleadas para el tratamiento de las células y los ratones. Para las medidas de absorbancia se utilizó un espectrofotómetro Lambda 35 (Perkin-Elmer Instruments) de doble haz en el rango UV-VIS (Figura 3.29).



Figura 3.29. Espectrofotómetro Lambda 35 de Perkin-Elmer (panel izquierdo), Lector de placas FLUOstar Omega (panel central) y lector de placas SpectraMax 340PC384 (panel derecho).

Lector de placas

Un lector de placas (también conocido como lector de microplacas o fotómetro de microplacas) es un instrumento de laboratorio que permite detectar eventos biológicos, químicos o físicos en muestras contenidas en placas de microtitulación. El formato de microplaca más comúnmente utilizado en los laboratorios de investigación o de diagnóstico clínico es de 96 pocillos (matriz de 8 por 12) con un volumen de reacción típica comprendido entre 100 y 200 μL por pocillo. Los modos comunes de detección para los ensayos de microplacas son: absorbancia, luminiscencia, intensidad de fluorescencia, fluorescencia resuelta en el tiempo y polarización de fluorescencia.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se emplearon dos lectores de placas para la medida en el modo de medida de absorbancia:

Por un lado se empleó un lector de placas FLUOstar Omega de BMG Labtech (Figura 3.29) para la realización de los ensayos de viabilidad mediante MTT y XTT, tal y como se ha indicado en el apartado 3.2.1 esta memoria.

Además, se empleó un lector de placas SpectraMax 340PC384 de Molecular Devices (Figura 3.29) para la realización de los ensayos de apoptosis (apartado 3.2.2.1), para la determinación del nivel de fólculo (apartado 3.3.5), para la cuantificación de MTX intracelular conjugado con HRP (apartado 3.3.9), para los ensayos de actividad PP2A (3.3.10) y para la cuantificación de las proteínas mediante la técnica de Bradford.

3.4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.4.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.4.1.1. Extracción de ADN genómico

Para la extracción del ADN genómico a partir de muestras celulares se utilizó el kit *DNeasy Tissue* (QIAGEN). Mediante este sistema, en primer lugar, las células se lisan utilizando proteinasa K y tampón de lisis. A continuación, se produce la adsorción del ADN presente en estos lisados celulares a una membrana de gel de sílice. Por último, se realiza una serie de lavados para eliminar posibles contaminantes y se eluye el ADN unido a la membrana (Figura 3.30).



Figura 3.30. Esquema del proceso de extracción de ADN genómico utilizando el kit *Dneasy Tissue* de Qiagen.

Procedimiento:

Para la extracción de ADN genómico se partió de muestras celulares de 5×10^6 células como máximo. En primer lugar, se sedimentaron las células, se descartó el sobrenadante y, el pellet resultante se resuspendió en 200 μ L de PBS conteniendo 20 μ L de proteinasa K. A continuación, se adicionaron 200 μ L de tampón de lisis (*buffer AL* proporcionado por el kit), se agitaron bien las muestras y se incubaron durante 10 minutos a 56°C en agitación continua para facilitar la lisis celular. Pasado este tiempo, se añadieron 200 μ L de etanol (96-100%) y se agitaron las muestras hasta obtener una suspensión homogénea. Se trasladó todo el volumen a la columna de purificación insertada en el interior de un tubo de centrifuga de 2 mL y se centrifugó a 6 000xg durante 1 minuto. El interior de esta columna presenta una membrana de gel de sílice de manera que, al someter el tubo a centrifugación, el ADN de la suspensión queda adherido a la membrana, mientras que el resto de componentes eluyen hacia la parte baja del tubo. A continuación, se descartó el volumen eluido y el tubo, y la columna se introdujo en un nuevo tubo de centrifuga de 2 mL. Se añadieron 500 μ L de tampón de lavado 1 (*buffer AW1* proporcionado por el kit) y se volvió a centrifugar a 6 000xg durante 1 minuto. De nuevo se descartó el volumen eluido y el tubo, y se introdujo la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 2 mL. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de tampón de lavado 2 (*buffer AW2* proporcionado por el kit) y se centrifugó a 6 000xg durante 3 minutos para secar la membrana y asegurar que no quedaran restos de etanol. A continuación, se descartó tanto el volumen eluido como el tubo, y la columna se introdujo en un tubo de 1.5 mL. Se añadieron 200 μ L de agua pura o tampón de elución (*buffer AE* proporcionado por el kit) y se incubó la membrana durante 1 minuto a temperatura ambiente. Por último, se centrifugó la membrana 1 minuto a 6 000xg para eluir el ADN genómico.

3.4.1.2. Extracción de ARN total

Para la extracción del ARN total a partir de células se utilizó el kit *PureLink™ RNA Mini* de Invitrogen. Mediante este procedimiento, las muestras son lisadas y homogenizadas en presencia de isotiocianato de guanidinio, que es una sal caotrópica que protege al ARN de las ARNasas endógenas. Después, se añade etanol a la muestra y se procesa a través de una columna de purificación. El ARN se une a la membrana de sílice situada en la base de la columna y las impurezas se eliminan mediante sucesivos lavados. Finalmente, el ARN purificado se eluye con agua y queda disponible para la obtención de ADNc que será usado para diferentes aplicaciones (Figura 3.31).

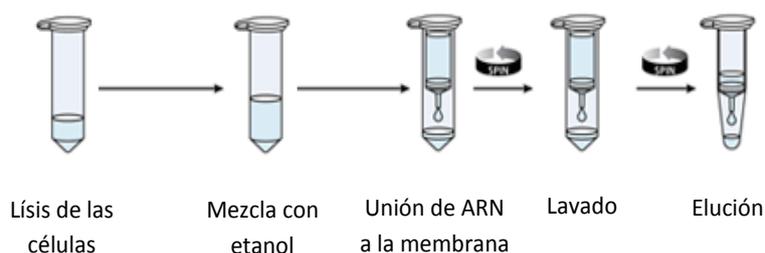


Figura 3.31. Esquema del proceso de extracción de ARN total utilizando el *PureLink™ RNA Mini Kit*.

Procedimiento:

Para la extracción del ARN total a partir de muestras celulares, se ajustó el volumen del tampón de lisis a la cantidad de células según las indicaciones del fabricante y se homogenizó mediante una jeringuilla, pasando la muestra repetidamente a través de la aguja. Una vez homogenizada la muestra, se añadió el volumen de etanol al 70% adecuado, en función de la cantidad de células de partida, siguiendo las indicaciones del fabricante. A continuación, esta mezcla se agitó mediante vórtex y se transfirieron 700 μ L de suspensión a la columna de purificación de ARN insertada en un tubo de centrifuga de 2 mL. Se centrifugó a 12 000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, se descartó el volumen eluido y se reinsertó la columna en el mismo tubo de centrifuga. Este paso se repitió hasta procesar la totalidad de la muestra inicial. Posteriormente, se añadieron 700 μ L del tampón de lavado 1 (*Wash Buffer I*, proporcionado por el kit) a la columna de purificación y se centrifugó a 12 000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente. Se descartaron el volumen eluido y el tubo de centrifuga, y se introdujo la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 2 mL. Se añadieron 500 μ L del tampón de lavado 2 (*Wash Buffer II*, proporcionado por el kit) y se centrifugó a 12 000xg durante 15 segundos a temperatura ambiente, descartando el volumen eluido. Se repitió este paso de lavado una vez más y, a continuación, se centrifugó la columna a 12 000xg durante 1 minuto para secar totalmente la membrana que contenía el ARN unido. Por último, se insertó la columna en un nuevo tubo de centrifuga de 1.5 mL y se añadieron 25 μ L de agua libre de ARNasas. Se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente y, finalmente, se eluyó el ARN mediante centrifugación a 12 000xg durante 2 minutos. Este ARN total obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.4.1.3. Extracción de ARNm

Para la extracción del ARNm se utilizó el kit *Illustra Quick Prep Micro mRNA Purification* de GE Healthcare Life Sciences. Este kit está diseñado para la extracción directa de ARN poliadenilado (la poliadenilación tiene lugar en el extremo 3' durante la maduración del ARN premensajero a mensajero), a partir de pequeñas cantidades de tejido o células eucariotas, sin la necesidad de la purificación intermedia del ARN total. Para ello, se extrae el tejido o las células en un tampón con una alta concentración de tiocianato de guanidina (GTC) para una rápida inactivación de ARNasas endógenas. En el caso de tejido, es necesario un paso previo de homogenización. Posteriormente, el extracto se diluye con tampón de elución para disminuir la concentración de GTC hasta un nivel lo suficientemente bajo para permitir la posterior formación de puentes de hidrógeno entre las colas de poli-adenosina [Poli-(A)] del ARNm y los oligo-(dT) anclados a una matriz de celulosa, pero lo suficientemente alto para mantener la inhibición de las ARNasas. Este paso de dilución supone, a su vez, un primer paso de purificación, puesto que van a precipitar una gran parte de las proteínas del extracto. El extracto se clarifica mediante centrifugación y el sobrenadante se pasa a un tubo de centrifuga que contiene la matriz de oligo-(dT)-celulosa. Se incuba durante varios minutos para permitir la formación de los puentes de hidrogeno entre las colas de poli-(A) del ARNm y la matriz de oligo-(dT)-celulosa y se centrifuga nuevamente descartando el sobrenadante. El precipitado se somete a una serie de lavados. En primer lugar, se lava con un tampón de alta concentración de sales y, después, con uno bajo en sales para eliminar la presencia de proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos contaminantes. Por último, se eluye el material poliadenilado, en una o dos veces, con el tampón de elución adecuado (Figura 3.32).

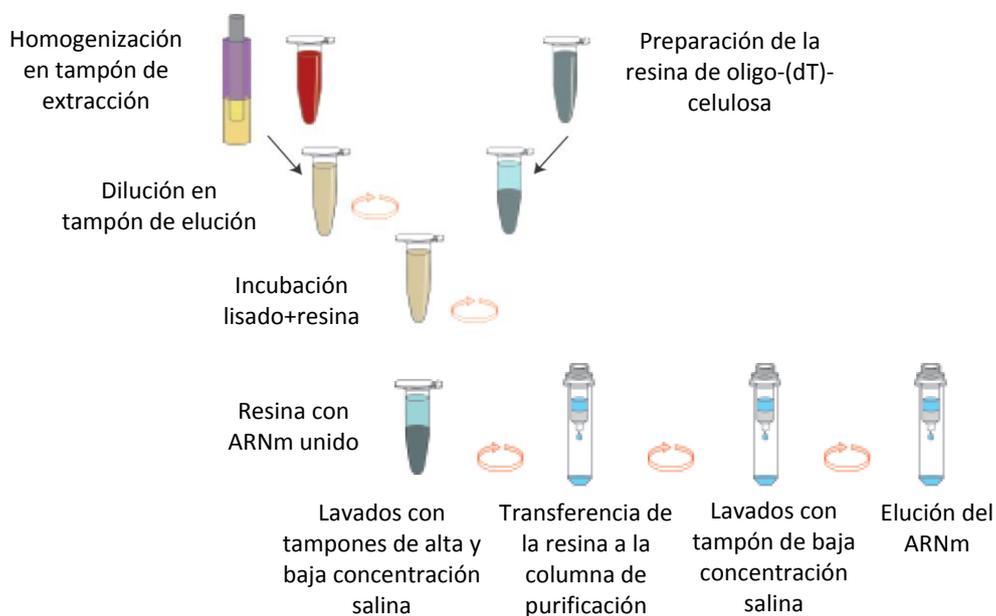


Figura 3.32. Esquema del proceso de purificación del ARN mensajero mediante el *ARNm Illustra Quick Prep Micro mRNA Purification Kit*.

Procedimiento:

En primer lugar se preparó la resina de celulosa con oligo-(dT). Para ello, se agitó el tubo de oligo-(dT)-celulosa (proporcionado por el proveedor del kit) hasta obtener una suspensión homogénea y se transfirió 1 mL de la misma a un tubo de centrifuga. Se centrifugó durante 10 segundos a 16 000xg y se retiró sobrenadante. En el caso de muestras tisulares, se añadieron 0.4 mL de tampón de extracción y se homogenizó el tejido (como máximo 0.1 g) utilizando un homogenizador Potter-Elvehjem sumergido en hielo. En el caso de muestras de células en cultivo, se resuspendieron los pellets celulares (como máximo 10^7 células) directamente en 0.4 mL de tampón de extracción y se agitaron mediante vórtex hasta obtener una suspensión homogénea. A continuación, se diluyó la muestra con 0.8 mL de tampón de elución y se agitó. Esta mezcla se centrifugó a 16 000xg durante 1 minuto a temperatura ambiente y el sobrenadante se traspasó al tubo preparado anteriormente con la matriz de oligo-(dT)-celulosa. Este sobrenadante se incubó con la matriz durante 3 minutos aplicando agitación por inversión para facilitar la formación de puentes de hidrógeno entre las colas de poli-(A) y los oligo-(dT) anclados a la matriz de celulosa. Pasado este tiempo, la mezcla se centrifugó a 16 000xg durante 10 segundos y se aspiró el sobrenadante. Para los lavados, primero se añadió 1 mL del tampón con alta concentración de sales, se mezcló por inversión, se centrifugó a 16 000xg durante 10 segundos y se aspiró el sobrenadante. Este paso se repitió 3-4 veces. A continuación, se lavó dos veces con 1 mL del tampón de baja concentración de sales, mezclando de la misma forma y centrifugando después a 350xg durante 2 minutos. Una vez finalizado el lavado, se añadieron 0.3 mL de tampón de baja concentración salina a la resina y se mezcló con una micropipeta, transfiriendo la resina a un columna situada en un tubo de centrifuga de 2 mL. Se centrifugó a 16 000xg durante 5 segundos y se descartó el volumen eluido. La columna se situó nuevamente en el tubo de centrifuga y se lavó otras 2-3 veces con 0.5 mL del tampón bajo en sales. Por último, se pasó la columna a un tubo de centrifuga nuevo y estéril y se añadieron 0.2 mL de tampón de elución, previamente atemperado a 65°C, sobre la resina. Para la elución del ARNm se centrifugó el tubo a máxima velocidad durante 5 segundos y el ARNm obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

3.4.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

La retrotranscripción (RT) o transcripción inversa es un proceso que implica la generación de una cadena de ADN complementario (ADNc) a partir de una de ARN de cadena simple por acción de la enzima transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. Esta enzima es una ADN polimerasa dependiente de ARN que está presente en los retrovirus como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH, el agente causal del SIDA). La RT es una herramienta ampliamente utilizada para el análisis de la expresión génica puesto que, el ADNc obtenido puede ser utilizado como molde en el proceso de PCR para dar lugar a millones de moléculas de ADN de doble cadena cuya cantidad puede ser cuantificada y es representativa de los niveles de ARNm presentes en la célula. Para ello, en primer lugar se extrae el ARNm de las células tal y como se ha especificado en el apartado 3.4.1. de esta memoria. Una vez purificado, se realiza la RT utilizando como cebador un oligo-(dT), es decir, un oligonucleótido formado por una corta secuencia de desoxirribonucleótidos de timidina que se une a la cola de poli-(A) presente en el extremo 3' de las moléculas de ARNm maduras y proporciona un extremo 3'-OH libre que puede ser elongado por la retrotranscriptasa. En algunos casos, es necesario eliminar la cadena de ARN del híbrido ARN:ADN para aumentar la pureza del ADNc previamente a la PCR que se realizará a continuación. Para ello, se puede utilizar la ARNasa H de *E. coli* o bien retrotranscriptasas que presentan actividad ARNasa H endógena (Figura 3.33).

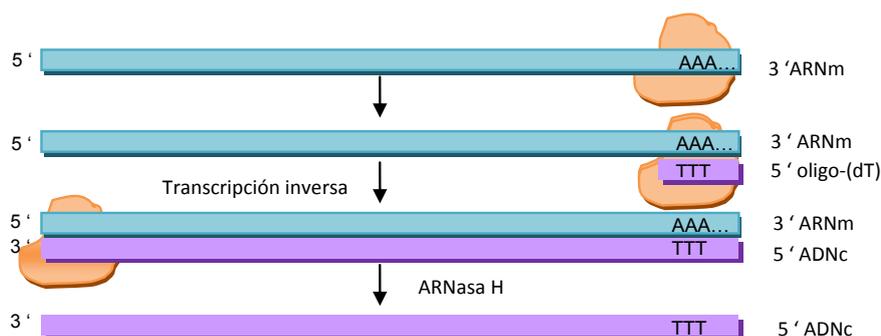


Figura 3.33. Esquema del proceso de transcripción inversa.

Esta técnica puede llevarse a cabo en el laboratorio con la ayuda de un termociclador, que consiste en un bloque de resistencia eléctrica que distribuye, a través de una placa, una temperatura homogénea durante tiempos que pueden ser programables, normalmente con rangos de temperatura de 4°C a 96°C. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizó un termociclador *Mastercycler Personal* de Eppendorf (Figura 3.34).



Figura 3.34. Termociclador Mastercycler Personal de Eppendorf.

Ningún método de purificación de ARN consigue eliminar totalmente la presencia de ADN en las muestras y, puesto que la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) puede detectar y amplificar incluso una única molécula de ADN, las muestras de ARN deben ser tratadas con desoxirribonucleasas (ADNasas) con el fin de eliminar el ADN contaminante antes de realizar la RT. Durante la realización de esta Tesis Doctoral se utilizó la ADNasa I (AMPD1), aislada de páncreas bovino, que digiere al ADN, tanto de cadena doble como de cadena sencilla, a sus correspondientes mono y oligonucleótidos.

Procedimiento:

En primer lugar, antes de la retrotranscripción, se diluyó el ARN (de 1 ng a 5 µg de ARN total o de 1 a 500 ng de ARNm) en agua libre de ARNasas para obtener un volumen final de 7 µL. A continuación se adicionaron 1 µL del tampón de la reacción (10X) y 2 µL de ADNasa I (1 unidad/µL) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción mediante la adición de 1 µL de una solución de parada que contiene 50 mM EDTA, el cual une a los

iones calcio y magnesio de la disolución, necesarios para la actuación de la ADNasa. Además, se desnaturalizó por calor la ADNasa presente en el medio de reacción para evitar que pudiera digerir el ADNc formado durante la retrotranscripción posterior. Para ello, el ARN tratado con ADNasa, se calentó a 70°C durante 10 minutos. Este paso de calentamiento, además de asegurar que la ADNasa ha sido totalmente desnaturalizada, permite desnaturalizar el ARN y eliminar las posibles estructuras secundarias que impedirían la unión de los *primers* o cebadores. Tanto la ADNasa I, como los tampones de reacción y de parada fueron obtenidos de Sigma-Aldrich.

Para realizar la RT, se adicionaron 10 μL de la disolución de ARNm obtenida de la digestión con ADNasa I a tubos de microcentrífuga libres de ADNasas y ARNasas e, inmediatamente antes de su uso, se preparó por cada tubo, una mezcla con los siguientes reactivos:

Componente	Cantidad (μL)
Tampón de reacción (5X)	4.6
Ditiotreitol (DTT; 0.1 M)	2.35
Oligo-(dT) ₂₀ (50 μM)	1.65
dNTPs (10 mM)	1.15
Inhibidor de ARNasas (130 U/ μL)	0.35
Agua libre de ARNasas	0.5

Todos estos reactivos fueron obtenidos de Invitrogen. La composición del tampón de reacción (5X) es TRIS-HCl 250 mM, KCl 375 mM y MgCl_2 15 mM. La mezcla de dNTPs es una solución acuosa (pH 7.5) de las sales sódicas de dATP, dCTP, dGTP y dTTP. Los cebadores usados variaron dependiendo del ARNm a retrotranscribir. Así, para aquellos que contenían una cola de poli-(A) extensa se utilizaron como cebadores los oligo-(dT)₂₀ de Invitrogen. Sin embargo, para ARNm que contenían una cola de poli-(A) menos extensa, se eligieron como cebadores los decámeros aleatorios de Stratagene. Estos decámeros aleatorios son secuencias de nucleótidos al azar que se unen al ARN y actúan como cebadores para la síntesis *in vitro* de ADNc. Al contrario que los cebadores específicos, permiten amplificar todo el ARN de la muestra, lo que es importante para amplificar los estándares internos en ensayos de cuantificación.

A continuación, se añadieron 10 μL de esta mezcla a cada tubo que contenía 10 μL del ARN desnaturalizado y tratado con ADNasas (volumen final 20 μL). Se agitó suavemente para mezclar los reactivos y se calentó a 42°C durante 2 minutos. De esta manera, se alcanza la temperatura óptima para que actúe la enzima y para que los cebadores se unan al ARN. Luego se adicionó a cada tubo 1 μL (200 U) de M-MLV RT (Retrotranscriptasa del Virus de la Leucemia Murina de Moloney) de Invitrogen. Se agitó suavemente y se dio un pulso de centrifuga para recoger todos los reactivos en el fondo del tubo. En esta mezcla todos los componentes se encuentran en exceso, de modo que el ARNm es el único elemento limitante en la reacción. A continuación, se colocaron los tubos en el termociclador y se mantuvieron a 42°C durante 50 minutos para permitir la síntesis de ADNc por

parte de la retrotranscriptasa. Para terminar, se elevó la temperatura a 72°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Finalizado el proceso, los tubos de reacción se centrifugaron y el ADNc se conservó a -20°C hasta su utilización.

3.4.3. ANALISIS DE LA CANTIDAD Y GRADO DE PUREZA DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

En biología molecular, muchas de las aplicaciones que utilizan ARN o ADN requieren la determinación de la cantidad y el grado de pureza de los mismos para obtener un rendimiento óptimo. Esta determinación se realiza generalmente mediante la medida de la cantidad de radiación ultravioleta absorbida por las bases nitrogenadas de los ácidos nucleicos. Pero cuando la cantidad de éstos en la muestra es baja se puede recurrir a la medida de la intensidad de fluorescencia emitida por un colorante fluorescente que se une a la molécula que queremos cuantificar.

3.4.3.1. Cuantificación mediante espectrofotometría UV

Los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta (UV) gracias a que las bases nitrogenadas aromáticas que forman parte de los nucleótidos presentan un máximo de absorción a 260 nm. Así, la concentración y la pureza de ADN o ARN en una muestra pueden ser determinadas mediante espectrofotometría ultravioleta (UV). Cada una de las bases nitrogenadas tiene su propio espectro de absorción y, por lo tanto, contribuye de forma diferente a la absorción total de radiación UV de una molécula de ADN o ARN. Para muchas aplicaciones, cuando se trata de ADN o ARN de alto peso molecular, el porcentaje de contribución de cada una de las bases al espectro de absorción UV de la molécula puede ignorarse. Sin embargo, cuando se trata de oligonucleótidos, la contribución de las distintas bases en función de la secuencia debe ser considerada si se requiere determinar correctamente la concentración.

A diferencia de los ácidos nucleicos, las proteínas absorben luz UV a 280 nm debido principalmente a los residuos de triptófano. Así, la medida de la absorbancia a 280 nm de una muestra de ácidos nucleicos nos da una estimación de la contaminación por proteínas de una muestra. En general, la lectura de absorbancia a 260 nm permite calcular la concentración de ácidos nucleicos, mientras que la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ($A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}}$) permite estimar el grado de pureza de los mismos.

Concentración y grado de pureza del ADN de doble cadena (ADNdc)

Para determinar la concentración y la pureza de una muestra de ADNdc (ADN de alto peso molecular, plásmidos, productos de PCR, etc.) se realiza una dilución adecuada de la muestra en agua libre de nucleasas o en tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) y se mide la absorbancia a 260 y 280 nm. Mediante este procedimiento se pueden detectar concentraciones de ADNdc desde 2.5 µg/mL. En general, una disolución de ADNdc de 50 µg/mL muestra un valor de absorbancia a 260 nm de 1. Así, la concentración de ADNdc de una muestra se puede determinar espectrofotométricamente utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{ADNdc}] (\mu\text{g/mL}) = A_{260\text{nm}} \times 50 \mu\text{g/mL} \times \text{FD}$$

donde $A^{260\text{nm}}$ es la absorbancia de la muestra a 260 nm y FD es el factor de dilución de la muestra en la cubeta.

La pureza del ADN se puede comprobar mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ($A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}}$). Una muestra de ADN se considera pura cuando esta relación de absorbancias está en torno a 1.8. En estas condiciones, el espectro de absorbancia debe mostrar un pico simétrico a 260 nm.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se empleó este procedimiento para la medida de la cantidad y el grado de pureza del ADN genómico obtenido en los procedimientos de extracción.

Concentración y grado de pureza del ARN de cadena sencilla (ARNsc)

Para determinar la concentración de una muestra de ARNsc se realiza una dilución adecuada de la muestra en agua libre de nucleasas o en tampón TE y se mide la absorbancia a 260 y 280 nm. En general, una disolución de ARNsc de 40 $\mu\text{g/mL}$ tiene un valor de absorbancia a 260 nm de 1, por lo que la concentración de ARNsc de una muestra se puede determinar espectrofotométricamente utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico mediante la siguiente ecuación:

$$[\text{ARNsc}] (\mu\text{g/mL}) = A^{260\text{nm}} \times 40 \mu\text{g/mL} \times \text{FD}$$

donde $A^{260\text{nm}}$ es la absorbancia de la muestra a 260 nm y FD es el factor de dilución de la muestra en la cubeta.

La pureza del ARNsc se puede comprobar mediante la relación de absorbancias a 260 y 280 nm ($A^{260\text{nm}}/A^{280\text{nm}}$). Una muestra de ARNsc se considera pura cuando esta relación de absorbancias está en torno a 2. En estas condiciones, el espectro de absorbancia debe mostrar un pico simétrico a 260 nm. Estas ecuaciones y criterios establecidos para el ARNsc pueden ser aplicados para el cálculo de la concentración y la pureza de ADN de cadena sencilla (ADNsc) de una muestra.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se empleó este procedimiento para la medida de la cantidad y el grado de pureza del ARN total y del ARNm obtenido en los procedimientos de extracción, así como de ADNc obtenido en la retrotranscripción previa a la técnica de PCR.

3.4.3.2. Cuantificación mediante el uso de marcadores fluorescentes

En aquellos casos en los que se obtuvo un bajo rendimiento en la extracción de ARN, la cuantificación se realizó mediante la plataforma de cuantificación Qubit™ de Invitrogen. Esta plataforma permite la cuantificación de ARN, ADN y proteínas y se basa en el uso de marcadores fluorogénicos (*Quant-iT™ dyes*) que se unen específicamente a la molécula que pretendemos cuantificar y, una vez unidos, aumentan varios cientos de veces su emisión de fluorescencia. Así, la medida de la fluorescencia emitida es proporcional a la cantidad de molécula de interés presente en la muestra. El fluorímetro Qubit es un dispositivo muy sencillo que permite excitar estos marcadores fluorescentes utilizando, como fuente de iluminación, una lámpara LED roja y otra azul. Este dispositivo detecta la fluorescencia emitida por los marcadores fluorescentes gracias a un fotodiodo y realiza el cálculo de la concentración de la molécula de interés presente en la muestra en base a la calibración realizada con unos estándares proporcionados por el kit. Este sistema de cuantificación es mucho más sensible que la espectrofotometría UV debido a que determina fluorescencia en lugar de absorbancia. Pero, además, como los marcadores fluorescentes son específicos para cada tipo de molécula, solo se detecta la fluorescencia debida a la molécula de interés por lo que la medida de la concentración es más precisa que la obtenida por espectrofotometría UV (Figura 3.35).



Figura 3.35. Plataforma Qubit™ para la cuantificación de ARN, ADN y proteínas.

3.4.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*) es una técnica de biología molecular que permite amplificar una secuencia específica de ADN (de cadena simple o de cadena doble) presente en una muestra compleja mediante un proceso cíclico para generar millones de copias que pueden ser utilizadas para diversas aplicaciones. Para llevar a cabo esta técnica se requieren dos oligonucleótidos (cebadores o *primers*) que son secuencias de ADN de cadena sencilla de entre 18 y 24 nucleótidos complementarias a los extremos del fragmento que se desea amplificar que proporcionan extremos 3' libres para la acción de la ADN polimerasa. Dadas las altas temperaturas que se alcanzan en cada ciclo, esta técnica requiere el uso de una polimerasa termoestable como la Taq polimerasa (obtenida de la bacteria termófila *Thermus aquaticus*) o la Pfu polimerasa (obtenida de *Pyrococcus furiosus*). La reacción necesita además la adición de los cuatro dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) como sustratos para la síntesis de ADN, y de un tampón que contenga iones Mg^{2+} y que mantenga un pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa.

Al igual que ocurre durante la replicación del ADN, durante la PCR la ADN polimerasa incorpora nucleótidos al extremo 3' del cebador unido al ADN molde. Pero en la PCR, este proceso se lleva a cabo mediante una serie de ciclos en los que los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. Cada ciclo se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, alineamiento y elongación.

En primer lugar, es necesario que el ADN se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de ADN se separen. Esta primera fase se conoce como **desnaturalización** y se lleva a cabo elevando la temperatura en torno a 94°C. El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al ADN molde. Esta segunda fase se conoce como fase de **alineamiento o hibridación**. La temperatura en esta fase depende de los cebadores utilizados y deberá ser lo suficientemente baja para permitir la formación de complejos estables entre los cebadores y las secuencias diana, pero lo suficientemente alta para impedir la unión con cualquier otra secuencia. Generalmente esta temperatura oscila entre los 35 y los 60°C. Por último, en la fase de **elongación o extensión**, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios al ADN molde a partir del extremo 3' libre de los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la ADN polimerasa empleada. Si se utiliza la Taq polimerasa

la temperatura de elongación suele ser de 72°C. A partir del tercer ciclo, comienza a aparecer un fragmento definido por los extremos 5' de los cebadores que contiene exactamente la secuencia que se desea amplificar. Este fragmento es que se acumula de manera exponencial durante la reacción (Figura 3.36).

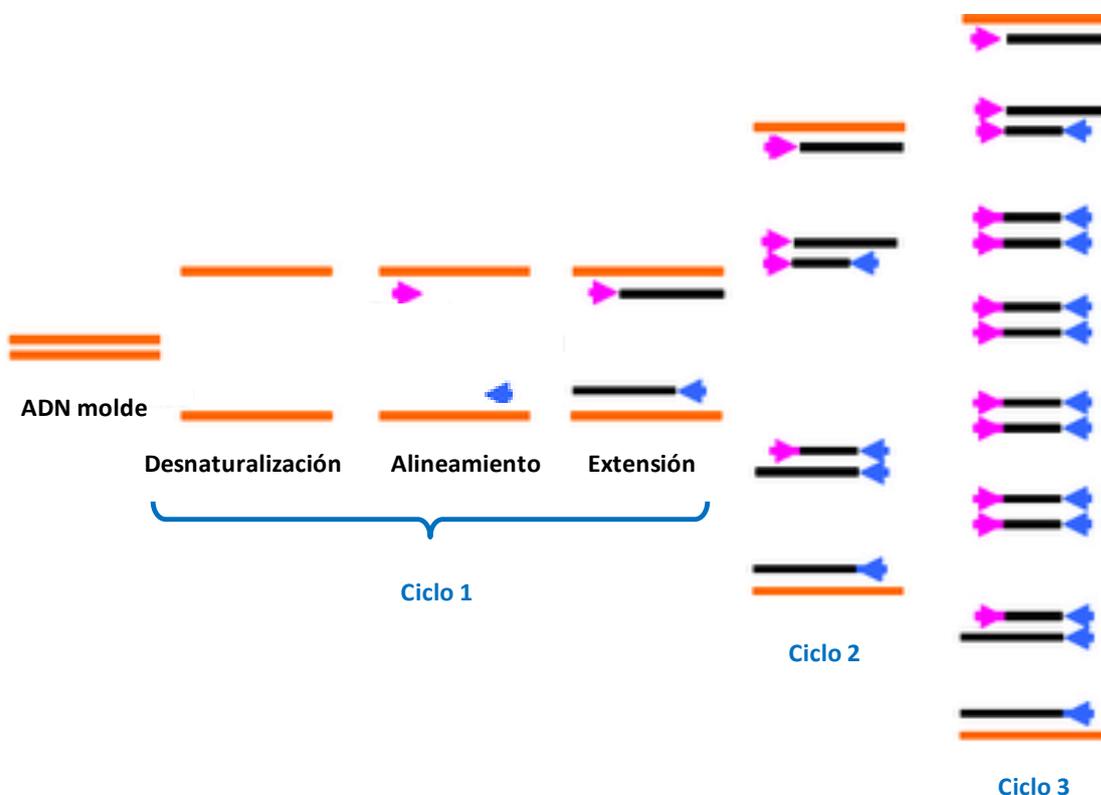


Figura 3.36. Esquema del proceso de PCR. Cada ciclo consta de tres etapas: (1) desnaturalización de las cadenas de ADN molde, (2) alineamiento o hibridación de los cebadores con la cadena molde y (3) extensión de la secuencia de ADN comprendida entre los cebadores.

3.4.4.1. PCR convencional

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se realizó PCR convencional para comprobar el funcionamiento de los *primers* y para la optimización de las condiciones experimentales. Para ello, se llevaron a cabo una serie de ensayos con el fin de determinar la cantidad de ADNc de partida, el número de ciclos y las condiciones de temperatura y tiempo óptimos en cada fase, para identificar los fragmentos amplificados en las distintas muestras. Así, para todos ellos se fijaron las siguientes condiciones para la PCR: se utilizaron 40 ciclos (desnaturalización a 94°C durante 1 minuto; hibridación a 62°C durante 1 minuto y extensión a 72°C durante 1 minuto) seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72°C. Estos experimentos se llevaron a cabo utilizando un termociclador *Mastercycler Personal* de Eppendorf, igual al utilizado para la RT.

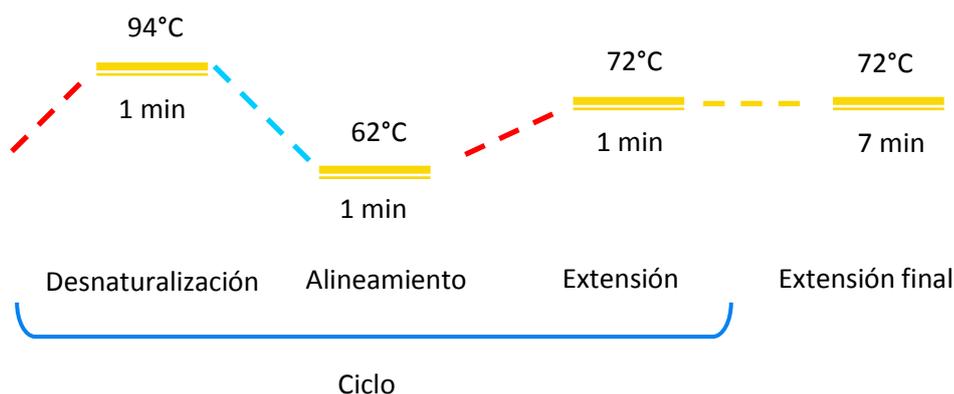


Figura 3.37. Esquema de las condiciones utilizadas para los experimentos de PCR convencional.

Procedimiento:

Para evitar amplificaciones inespecíficas, todos los reactivos se mantuvieron en hielo y no se mezclaron hasta el último momento. Para amplificar todos los transcritos se partió de 2 μL de ADNc (aproximadamente 0.4 μg). A continuación, se adicionó sobre la pared del tubo para evitar el contacto con el ADNc hasta el inicio de la PCR, 1 μL de cada uno de los *primers forward* y *reverse* específicos (lo que asegura una concentración final de 0.25 μM de cada uno). A la mezcla, conteniendo el ADNc y los *primers*, se le añadieron 46 μL de *PCR SuperMix* de Invitrogen que contiene una mezcla de sales, Mg^{2+} , dNTPs y Taq ADN polimerasa para una amplificación eficiente del ADNc. Los componentes de esta mezcla fueron: TRIS-HCl 22 mM (pH 8.4), KCl 55 mM, MgCl_2 1.65 mM, dGTP 220 μM , dATP 220 μM , dTTP 220 μM , dCTP 220 μM , 22 unidades de Taq ADN polimerasa recombinante y estabilizadores. Una vez que se tenían todos los componentes de la mezcla en el tubo, se agitó y se centrifugó a 800xg durante 30 segundos para reunir todo el contenido en el fondo del tubo. Tras colocarlos en el termociclador se inició el programa de la PCR diseñado con las condiciones de reacción determinadas anteriormente. Para verificar la especificidad de los resultados obtenidos, se realizaron controles negativos en los que uno o varios componentes de la reacción se sustituyeron por un volumen equivalente de agua libre de ARNasas. Una vez finalizado el programa, se centrifugaron los tubos nuevamente y los productos de la PCR se almacenaron a -20°C . Posteriormente, el éxito de la amplificación fue verificado mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.4.4.2. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR, acrónimo del inglés *quantitative polymerase chain reaction*) es una modificación de la técnica de PCR, introducida por Higuchi y colaboradores en 1992, que supuso una auténtica revolución en la investigación biomédica. Esta técnica permite la detección y cuantificación precisa del producto generado en la PCR simultáneamente al proceso de amplificación gracias a la utilización de una tecnología fluorescente. Esta tecnología se basa en el uso de fluoróforos específicos que cuando se unen al ADNc incrementan enormemente su fluorescencia, o bien en el uso de sondas de oligonucleótidos que son específicas para la secuencia a amplificar etiquetadas con fluoróforos. En ambos casos, la emisión de fluorescencia es proporcional a la cantidad del producto generado durante la PCR y es cuantificada tras cada ciclo de amplificación.

De esta manera, podemos conocer en todo momento la cinética de la reacción de amplificación y, por ello, a esta técnica se la denomina “a tiempo real”.

Para llevar a cabo la qPCR se utilizan termocicladores especiales que incorporan sensores para medir la fluorescencia emitida por cada uno de los viales o pocillos tras excitar el fluoróforo con un haz de luz de una longitud de onda apropiada. Durante la realización de esta Tesis Doctoral, los experimentos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo en el equipo *7500 Real Time PCR System* de Applied Biosystems situado en la Sección de Biología Molecular de la Universidad de Murcia (Figura 3.38). Además, como fluoróforo se utilizó el agente intercalante *SYBR Green I* que se une con gran afinidad al surco menor del ADNdc, aumentando su fluorescencia unas 1 000 veces (Figura 3.39). El incremento de ADN en cada ciclo de amplificación se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección tiene la ventaja de que la optimización de las condiciones de la reacción es muy fácil y, además, es más económico que el uso de sondas específicas. El principal inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen indistintamente a productos inespecíficos generados o a dímeros de cebadores (*primer dimers*), muy frecuentes en la PCR. Para mejorar la especificidad se deben optimizar las condiciones de la reacción y diseñar o seleccionar cuidadosamente los *primers* para disminuir el riesgo de formación de dímeros.

Es recomendable iniciar la reacción de síntesis de ADN a temperaturas elevadas (*Hot start PCR*), lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. Además, la mayoría de los equipos para PCR a tiempo real son capaces de determinar la curva de fusión (*melting curve*) de los productos de la reacción. Esta determinación se realiza generalmente al final del proceso de amplificación y consiste en la medida de la fluorescencia en función del aumento de temperatura, siendo la fluorescencia detectada dependiente de la presencia de secuencias de doble cadena de ADN puesto que a medida que las dos cadenas de ADN se separan por el efecto de la temperatura, la fluorescencia disminuye porque el fluorocromo deja de estar unido a ellas. En estas curvas se puede definir un parámetro denominado temperatura de fusión o T_m (acrónimo del inglés *melting temperature*) de los fragmentos amplificados que hace referencia a la temperatura a la que el 50% del ADN de la molécula está desnaturalizado. Cada fragmento amplificado tiene una curva de fusión y una T_m característica, que depende, sobre todo, de su longitud y de su composición de bases. Esta aplicación permite comprobar, aunque no siempre con absoluta garantía, la especificidad de los fragmentos detectados en la PCR (Figura 3.38).

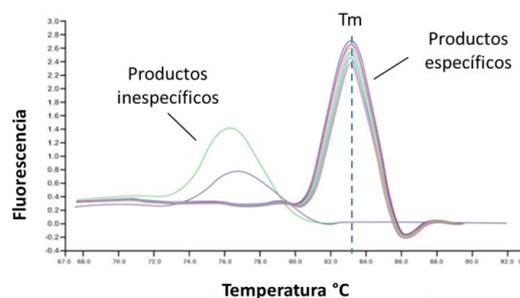


Figura 3.38. Equipo 7500 Real Time PCR System de Applied Biosystems (panel izquierdo). Curvas de desnaturalización y T_m de los productos de PCR a tiempo real (panel derecho).

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, la PCR a tiempo real se empleó para el análisis de los niveles de expresión génica mediante la combinación de esta técnica con la técnica de retrotranscripción. En este caso, el molde que se emplea para la PCR cuantitativa es el ADN complementario (ADNc), de hebra simple, obtenido por retrotranscripción del ARNm presente en las células. Esta combinación de técnicas se denomina RT-PCR cuantitativa o a tiempo real, o RT-qPCR. La cuantificación de la expresión génica por PCR a tiempo real se puede realizar en términos absolutos o en términos relativos. El método de cuantificación absoluta se basa en relacionar la señal de amplificación obtenida por PCR a tiempo real con el contenido en ADN empleando una curva de calibración. Por el contrario, la cuantificación relativa no requiere curva de calibración, sino que esta técnica se sustenta en la comparación entre el nivel de expresión del gen de estudio (nivel de ADNc que es proporcional al nivel de ARNm presente en la muestra de partida) respecto del nivel de expresión de un gen de referencia (en inglés *housekeeping gene*) cuya expresión en las células estudiadas se considera constante, independientemente de las condiciones a las que se sometan. Por tanto, es irrelevante en qué unidades se expresa la cuantificación, y sus resultados son comparables entre múltiples experimentos de RT-qPCR.

En los ensayos de PCR a tiempo real llevados a cabo durante este trabajo, los análisis se realizaron mediante cuantificación relativa. En un ensayo tipo, se adiciona en los pocillos de la placa de PCR a tiempo real una cantidad de ADNc, los cebadores complementarios a los extremos del fragmento que queremos amplificar y una mezcla que contiene la polimerasa, los dNTPs y el fluorocromo *SYBR Green I*. Durante cada ciclo de amplificación, se irá incorporando el fluorocromo a las hebras de ADN de doble cadena generadas y, por lo tanto, se irá incrementando la fluorescencia (Figura 3.39). El sistema de PCR a tiempo real va registrando la fluorescencia de forma que, en un número de ciclo determinado, dependiendo de lo abundante que sea ese gen en el ADNc (y por tanto en el ARNm de partida), se acumule una fluorescencia que sobrepase el umbral de detección establecido (en inglés, *threshold*) en la fase exponencial de fluorescencia denominado ciclo umbral o Ct (del inglés *Cycle threshold*). El método de cuantificación relativa se basa en comparar el Ct del gen de estudio respecto del Ct del gen de referencia (β -actina, GAPDH, etc.). Mediante el modelo matemático del delta Ct (Δ Ct) podemos determinar el número de copias de un gen respecto al número de copias del gen de referencia (β -actina en nuestro caso), asumiendo que la eficiencia de amplificación de la PCR es del 100% para el gen en estudio y el de referencia:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gen de estudio}) - \text{Ct} (\beta\text{-actina})$$

$$2^{-\Delta\text{Ct}} = \text{número de copias del gen de interés/copia de } \beta\text{-actina}$$

Además, esta cuantificación relativa también permite conocer la variación en la expresión de un gen determinado cuando las células han sido sometidas a distintos tratamientos o expuestas a diferentes situaciones experimentales. Para ello, se utiliza el modelo matemático del delta-delta Ct ($\Delta\Delta$ Ct), que permite comparar el número de copias del gen de interés respecto al número de copias del gen de referencia, en los distintos tratamientos o situaciones experimentales:

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

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ = nº de veces que varía la expresión de un gen tras un tratamiento, respecto al control no tratado.

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

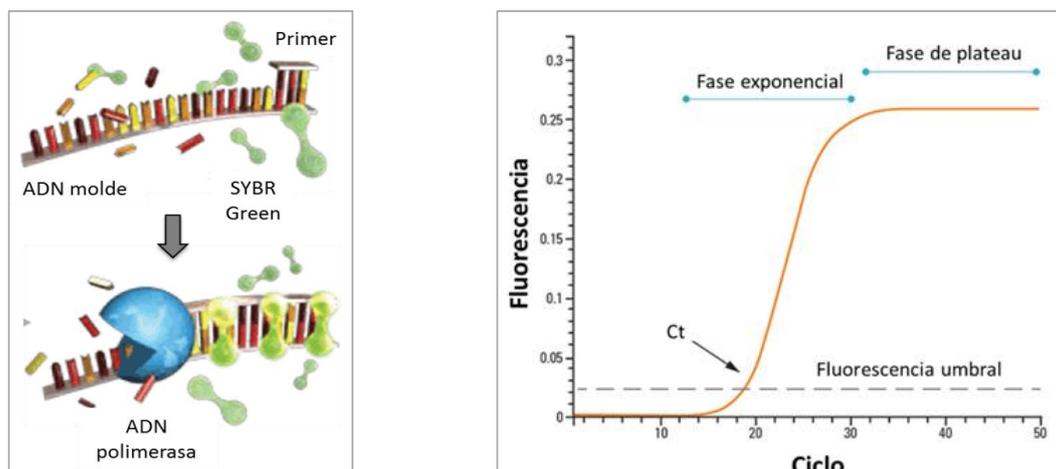


Figura 3.39. Esquema del funcionamiento del fluorocromo SYBR Green (panel izquierdo). Curva de amplificación en una PCR a tiempo real (panel derecho).

Procedimiento:

Los ensayos de PCR a tiempo real se llevaron a cabo utilizando placas de 96 pocillos (*Microamp optical 96 well reaction plates* de Applied Biosystems). En cada pocillo de la placa se adicionaron 8 μL del ADNc conteniendo 0.4-0.04 μg , 1 μL de cada uno de los *primers forward* y *reverse* (10 μM) y 10 μL de la mezcla de reacción *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems) que contiene el fluorocromo *SYBR Green I*, los cuatro dNTPs, la ADN polimerasa *AmpliTaq Gold* y el fluoróforo ROX como referencia pasiva, todo ello en un tampón optimizado para la reacción. La *AmpliTaq Gold* ADN polimerasa se encuentra en estado inactivo y se activa sólo a elevadas temperaturas. Esto permite llevar a cabo una PCR *Hot Start*, lo que evita la formación de dímeros de *primers* o la elongación inespecífica de los *primers* durante la preparación de la PCR. Además, la presencia del fluoróforo ROX ayuda a eliminar la fluorescencia residual de la placa y permite la detección de la fluorescencia del *SYBR Green I* con una mayor sensibilidad y eficacia. Una vez adicionados todos los reactivos a los pocillos, se selló la placa con un adhesivo especial (para evitar la evaporación durante el calentamiento) y se centrifugó a 1 500 rpm durante 1 minuto para reunir todos los reactivos en el fondo de los pocillos. Por último, se introdujo la placa en el termociclador (*7500 Real Time PCR System* de Applied Biosystems) y se estableció el programa con las condiciones deseadas. El programa de amplificación consistió en una etapa de calentamiento inicial a 95°C (10 minutos) para activar a la Taq Hot Start ADN polimerasa, seguido de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 62°C durante 1 minuto, donde se produjo el alineamiento y la extensión del ADN. Una vez terminada la amplificación, el programa realizó una serie de etapas (95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto y 95°C durante 15 segundos) para establecer la curva de desnaturalización del fragmento de ADN amplificado y determinar la T_m (Figura 3.40).

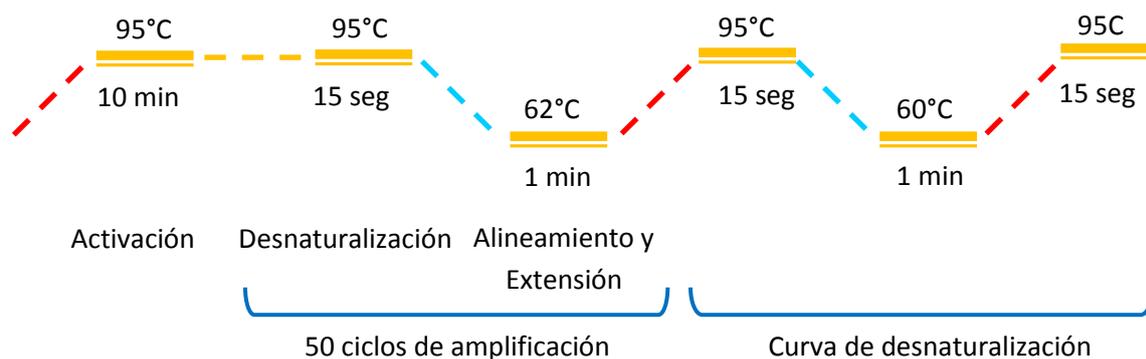


Figura 3.40. Esquema de las condiciones utilizadas para los experimentos de PCR a tiempo real.

3.4.5. ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS EN GEL DE AGAROSA

Esta técnica consiste en la separación de moléculas de ácidos nucleicos a través de una matriz tamponada de agarosa que funciona a modo de tamiz molecular, separando las moléculas bajo la acción de un campo eléctrico, de acuerdo al tamaño y la carga neta que poseen. En el caso de los ácidos nucleicos, los grupos fosfato son los responsables de la carga negativa de la molécula en condiciones de pH superior a 5, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis. La resolución y velocidad de separación de los fragmentos de ADN o ARN por electroforesis dependen de la concentración de agarosa en el gel y el voltaje aplicado durante la electroforesis. Así, la agarosa funciona como un tamiz en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo que aquellos de mayor tamaño, de manera que la distancia recorrida por las moléculas de ácidos nucleicos va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento de los fragmentos a lo largo del gel, permitiendo obtener una mayor resolución en la separación de los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje, por su parte, aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel.

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante la adición de colorantes fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad, estimar su tamaño e incluso su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de tamaño o de concentración conocidas, respectivamente. Los colorantes fluorescentes se añaden a la disolución de agarosa y actúan mediante inserción entre los pares de bases que conforman los ácidos nucleicos. El bromuro de etidio es uno de estos colorantes fluorescentes ampliamente utilizado para la visualización de ADN y ARN. Sin embargo, es un reactivo altamente tóxico, con propiedades mutagénicas, por lo que debe manejarse con extremo cuidado en el laboratorio. En la actualidad existen colorantes fluorescentes alternativos como *SYBR Safe*, *SYBR Gold*, *SYBR Green I*, *Vistra Green* o *peqGREEN* desarrollados específicamente para reducir estos riesgos. Tras la electroforesis, se coloca el gel sobre un transiluminador de luz UV para poder visualizar las bandas correspondientes a las moléculas de ADN presentes en las muestras aplicadas en el gel, así como los marcadores de peso molecular (Figura 3.41).

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, la electroforesis de ácidos nucleicos se utilizó para detectar los productos de reacción de PCR (geles al 1-3% de agarosa), para comprobar la adecuada

fragmentación del ADN tras la sonicación previa a la inmunoprecipitación de cromatina (1.5%), así como para visualizar la fragmentación del ADN en estudios de apoptosis (geles al 0.8% de agarosa).

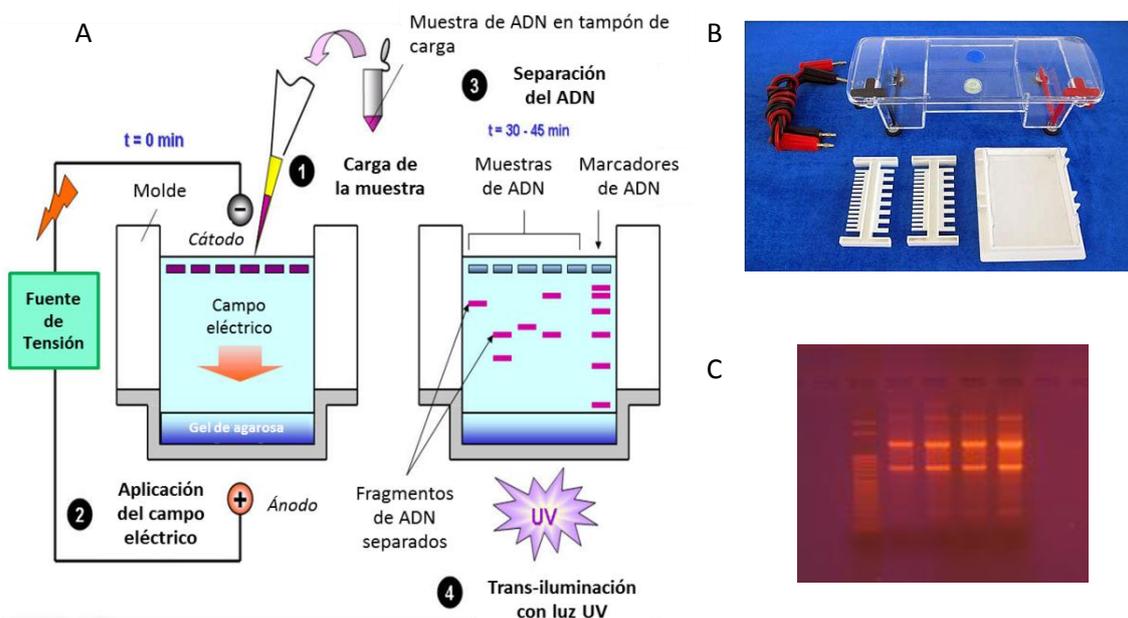


Figura 3.41. (A) Esquema del proceso de electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa. (B) Sistema de electroforesis. (C) Visualización de un gel de agarosa en el transiluminador UV.

Procedimiento:

En primer lugar, se preparó el gel de agarosa para lo cual se diluyó la cantidad adecuada de agarosa (en función del porcentaje al que deseáramos preparar el gel) y se añadieron 100 mL de tampón de electroforesis TAE (TRIS-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8.5). Para facilitar la fusión de la agarosa, se calentó esta disolución en el microondas. A continuación, se enfrió esta disolución hasta aproximadamente 50°C, se añadieron 5 μ L de bromuro de etidio (10 mg/mL) y, tras mezclar adecuadamente, se vertió la disolución de agarosa sobre un molde previamente sellado con cinta adhesiva sobre el cual se había colocado un peine para formar los pocillos. El gel se dejó polimerizar durante unos 30 minutos a temperatura ambiente.

A continuación, se tomaron 15-20 μ L de cada muestra de ADN y se le añadieron 3 μ L de un tampón de carga que contiene el colorante Orange G 0,25% (p/v), sacarosa 40% (p/v), EDTA 10 mM y SDS 100 mM. La sacarosa facilita el depósito de la muestra, mientras que el colorante nos informa del avance del frente durante la electroforesis. Este tampón también se añadió a los marcadores de peso molecular (*Step ladder* 50 pb de Sigma), que constan de 17 fragmentos de ADN romos cuyo tamaño varía desde 50 a 3 000 pb, distribuidos de la siguiente manera: entre 50 y 500 pb se encuentran distanciados cada 50 pb, entre 600 y 1 000, cada 100 pb, y entre 1 000 y 3 000, cada 1 000 pb.

Una vez polimerizado el gel se retiraron el peine y la cinta adhesiva del soporte y se colocó en la cubeta de electroforesis con los pocillos próximos al cátodo (polo negativo, de color negro). Se añadió tampón de electroforesis TAE hasta cubrir completamente el gel y se cargaron 10 μ L de marcadores de peso molecular y, entre 10 y 20 μ L de cada muestra (dependiendo del grosor del

peine utilizado para formar los pocillos). Se tapó la cubeta de electroforesis, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se realizó la electroforesis a 90 V entre 60-120 minutos.

Para visualizar el ADN separado mediante electroforesis se colocó el gel en un transiluminador de luz UV (Vilber Lourmat) y se captó la imagen con una cámara digital Canon IXUS 80015 a la que se le acopló un filtro naranja. El tamaño de cada banda se estimó en relación al de los marcadores de peso molecular, y la intensidad de las bandas se analizó con el programa *Gel-Pro Analyzer* versión 3.1. Alternativamente, se utilizó el sistema *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad Laboratories) junto con el software *Image Lab*, que, además de facilitar la visualización y la captura de imágenes, permite realizar el análisis de las bandas obtenidas tras la separación.

3.4.6. ENSAYO COMETA

El ensayo cometa, también llamado electroforesis en gel de células individuales, es un método sencillo y efectivo que permite evaluar el daño en el ADN de las células. Se basa en la capacidad de los fragmentos de ADN rotos y desnaturalizados de migrar fuera del nucleoide bajo la influencia de un campo eléctrico, mientras que el ADN no dañado migra más despacio y permanece confinado en el nucleoide. La evaluación de la forma y el tamaño de la cola del “cometa” y del patrón de migración permiten evaluar la intensidad del daño al ADN. Existen dos variantes de este método. El ensayo cometa neutro se utiliza generalmente para detectar roturas de doble cadena en el ADN, mientras que el ensayo cometa alcalino es más sensible y se utiliza para detectar daños menores en el ADN incluyendo, además de roturas dobles en el ADN, roturas simples, sitios abásicos y aductos del ADN lábiles a los álcalis.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se realizó ensayo cometa en condiciones alcalinas para determinar la magnitud del daño en el ADN de las células de melanoma inducido por el tratamiento combinado con MTX y TMECG. Para la realización de este ensayo, las células se incluyen y se inmovilizan en una matriz de agarosa de bajo punto de fusión en un portaobjetos especial (*Trevigen CometSlide™*). A continuación se someten a una lisis suave y se tratan con un álcali para desnaturalizar el ADN e hidrolizar los lugares dañados. Los nucleoides resultantes de la lisis celular se someten a electroforesis en una solución alcalina especial ($\text{pH}>13$) y, por último, el ADN se tiñe con un colorante intercalante fluorescente (como el *SYBR® Gold*, cuyos máximos de excitación y emisión son 496 y 522 nm, respectivamente). El resultado de la electroforesis se analiza mediante visualización por microscopía de epifluorescencia (Figura 3.42).

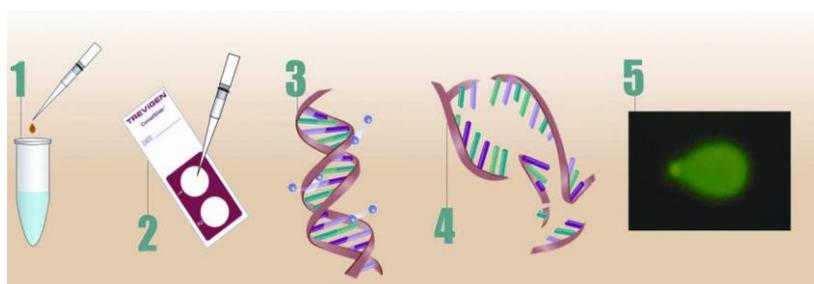


Figura 3.42. Esquema de los pasos para llevar a cabo un ensayo cometa. (1) Las células se mezclan con agarosa de bajo punto de fusión a 37°C y (2) se inmovilizan en los portas especiales *CometSlide™*. (3) Se lisan las células para eliminar las membranas y separar las histonas del ADN. (4) Las muestras se tratan con un álcali que desenrolla y desnaturaliza el ADN. (5) Tras la electroforesis alcalina, se tiñen las muestras y se visualizan al microscopio de epifluorescencia.

El análisis de las imágenes se puede realizar mediante un programa informático de análisis de imagen que permita calcular la longitud y el porcentaje de ADN en la cola del cometa.

Procedimiento:

Las células sometidas a los tratamientos correspondientes se tripsinizaron y se sedimentaron. Los pellets de células se resuspendieron y se lavaron con PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} (para inhibir la acción de las endonucleasas) y se realizó un recuento celular. A continuación, se volvieron a sedimentar y los pellets se resuspendieron de nuevo en PBS libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} enfriado en hielo a una concentración de 1×10^5 células/mL. Además de las células tratadas con los compuestos indicados, se introdujeron controles de células no tratadas para determinar el nivel de daño endógeno de las células y los daños introducidos durante el procesamiento de las muestras.

Durante la preparación de la suspensión celular, se fundió la agarosa mediante incubación en un baño de agua hirviendo durante 5 minutos y se dejó enfriar mediante incubación en un baño a 37°C durante 20 minutos. Seguidamente, se mezclaron $50 \mu\text{L}$ de suspensión celular con $500 \mu\text{L}$ de agarosa fundida en una proporción 1:10 (v/v) e inmediatamente se extendieron $50 \mu\text{L}$ de esta mezcla sobre el área marcada en los portas *CometSlide*TM. Los portaobjetos se incubaron a 4°C en oscuridad durante 10 minutos para permitir la gelificación de la agarosa. Seguidamente se sumergieron los portas en *Lysis solution* (proporcionada por el kit), previamente enfriada a 4°C , durante 60 minutos. A continuación, se sumergieron los portas en *Alkaline Unwinding Solution* (proporcionada por el kit) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Esta solución tiene un pH superior a 13 y facilita el desenrollamiento y la desnaturalización del ADN de las muestras. Tras esta incubación, se llevó a cabo la electroforesis utilizando la unidad especial para los portas del ensayo cometa *CometAssay*[®] *ES*. Como tampón de electroforesis se utilizó *Alkaline Electrophoresis Solution* (proporcionada por el kit) enfriada previamente a 4°C y la electroforesis se realizó a un voltaje de 21 V durante 30 minutos. Tras la electroforesis, se dejaron secar las muestras a 37°C durante 15 minutos para permitir que las células se dispusieran en un mismo plano para facilitar la observación al microscopio. Para teñir el ADN, se añadieron $100 \mu\text{L}$ de *SYBR*[®] *Gold* sobre el área de las muestras y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se retiró el exceso de colorante de los portaobjetos, se enjuagaron con agua y se incubaron a 37°C hasta que se secaron completamente. Los portas, así preparados, se visualizaron mediante microscopia de epifluorescencia, utilizando el filtro para fluoresceína. La magnitud del daño en el ADN se determinó a partir de la longitud y el porcentaje de ADN presente en la cola del cometa utilizando un programa informático de análisis de imagen.

3.4.7. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA

La inmunoprecipitación de cromatina (ChIP, acrónimo del inglés *chromatin immunoprecipitation*) es una técnica que permite determinar la distribución *in vivo* de proteínas asociadas con el ADN cromosómico. Estas proteínas pueden ser subunidades de histona o modificaciones postraduccionales de las mismas, o bien otras proteínas asociadas a la cromatina tales como factores de transcripción o reguladores de la estructura de la cromatina. De esta manera, la ChIP puede servir para identificar regiones del genoma asociadas con estas proteínas o, a la inversa, para identificar proteínas asociadas con una región particular del genoma. La obtención de

mapas de interacciones proteína-ADN o modificaciones de histonas mediante CHIP puede darnos una idea de las redes implicadas en la regulación de la función génica.

Esta metodología implica el entrecruzamiento con formaldehído para fijar las interacciones entre las proteínas y el ADN y asegurar la co-precipitación. A continuación, se lisan las células y los lisados celulares se someten a sonicación para fragmentar la cromatina. Una vez fragmentada, la cromatina se somete a inmunoprecipitación con un anticuerpo específico frente a la proteína cuya asociación con el ADN queremos estudiar. Por último, se rompen las interacciones entre el ADN y las proteínas y se purifican los fragmentos de ADN que han co-inmunoprecipitado con la proteína de interés. Estos fragmentos pueden identificarse mediante una gran variedad de métodos incluyendo PCR, microarrays de ADN o secuenciación, entre otros (Figura 3.43).

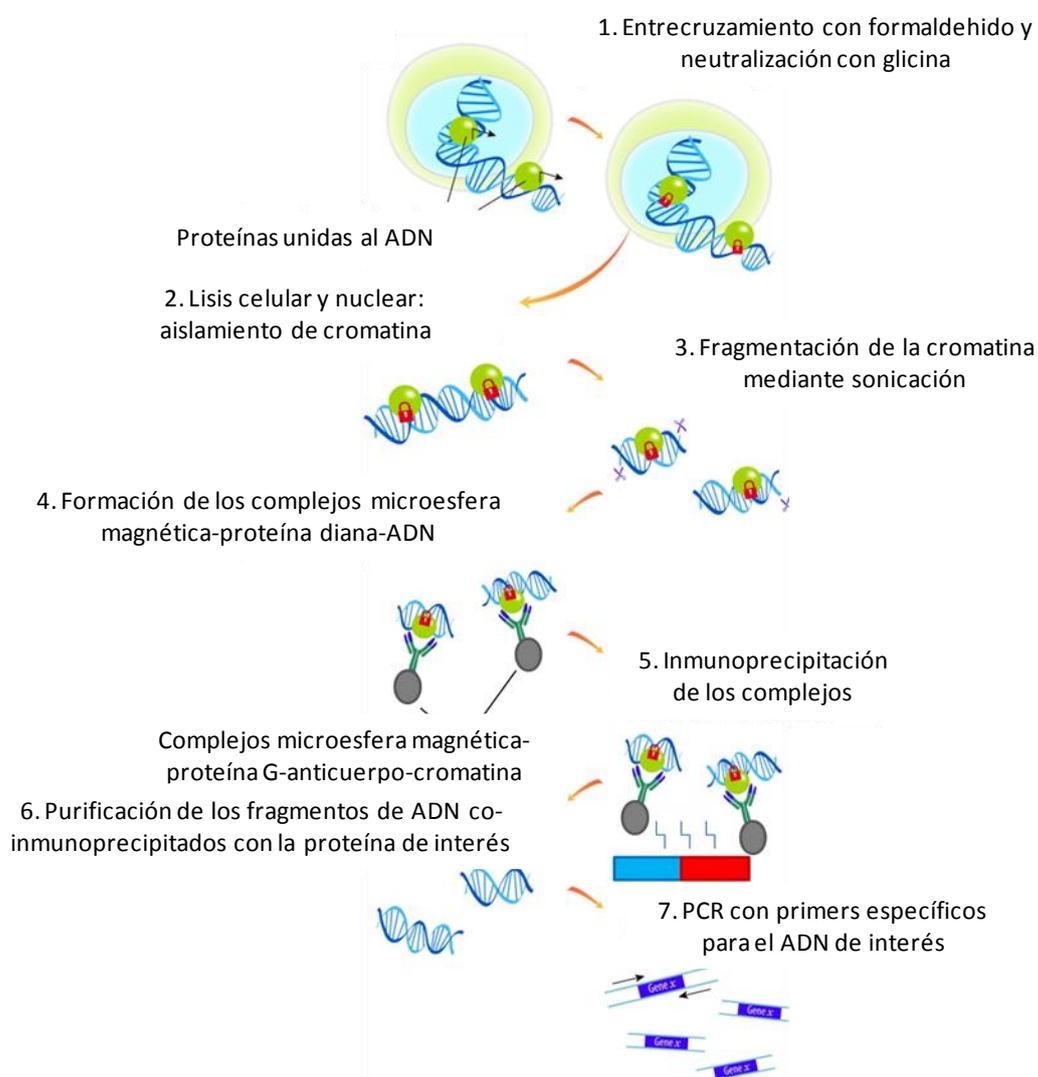


Figura 3.43. Esquema del proceso de inmunoprecipitación de cromatina.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, se realizó ChIP seguida de qPCR para determinar la ocupación de la región promotora de ciertos genes por determinados factores de transcripción en células de melanoma sometidas a distintas condiciones experimentales.

Los ensayos de ChIP se llevaron a cabo utilizando el kit *Magna ChIPTM G* (Millipore) que permite la inmunoprecipitación a partir de muestras celulares en un solo día. Este kit contiene además de todos los reactivos necesarios, un anticuerpo frente a la ARN polimerasa II y una IgG normal de ratón para llevar a cabo las reacciones de inmunoprecipitación de cromatina que constituirán los controles positivo y negativo, respectivamente. La ARN polimerasa II cataliza la transcripción de genes codificantes de proteínas, por lo que está presente en la región promotora de los genes transcripcionalmente activos. El gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) es un gen de expresión constitutiva en la mayoría de células de mamífero, por lo que tras la inmunoprecipitación de cromatina con anti-ARN polimerasa II, el ADN resultante estará enriquecido en el gen *GAPDH* (así como de todos los genes transcritos por la ARN polimerasa II). Sin embargo, la inmunoprecipitación con anti-IgG normal de ratón no debería resultar en un enriquecimiento en el gen *GAPDH*.

Para la purificación del ADN, este kit proporciona unas columnas de polipropileno que contienen una membrana de filtración de sílice diseñada especialmente para capturar los fragmentos de ADN resultantes de la ChIP y separarlos de proteínas y otros restos celulares contaminantes.

Procedimiento:

Entrecruzamiento y lisis

En primer lugar, se sembraron las células en frascos de cultivo de 150 cm² y se sometieron a los tratamientos deseados procurando que la cantidad de células al final de cada ensayo fuera próxima a 1×10^7 , suficiente para llevar a cabo 10 reacciones de inmunoprecipitación. A continuación, se adicionó formaldehído al medio de cultivo a una concentración final del 1% y se incubaron los frascos a temperatura ambiente durante 10 minutos para fijar las interacciones proteína-ADN. Pasado este tiempo, se añadieron 2 mL de glicina 10X y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para inactivar el formaldehído que quedaba sin reaccionar. Después, se depositaron los frascos en hielo, se retiró el medio y se lavaron las células con PBS frío dos veces. A continuación, se añadieron 2 mL de PBS conteniendo inhibidores de proteasas (5 μ L/mL), se recogieron las células con un raspador, se pasaron a un tubo de centrifuga y se centrifugaron a 800xg durante 5 minutos a 4°C. El pellet de células resultante se resuspendió en 0.5 mL de tampón de lisis, conteniendo 2.5 μ L de inhibidores de proteasas, y se incubó en hielo durante 15 minutos, agitando mediante vórtex cada 5 minutos. Seguidamente, se centrifugó la suspensión celular a 800xg durante 5 minutos a 4°C para sedimentar los núcleos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 0.5 mL de tampón de lisis nuclear conteniendo 2.5 μ L de inhibidores de proteasas.

Fragmentación del ADN

A continuación, las muestras se sometieron a sonicación mediante tres pulsos de 15 segundos *on*, 50 segundos *off*, utilizando un sonicador modelo 4710 Series (Cole-Parmer Instrument). Estas condiciones fueron optimizadas previamente para lograr romper la cromatina en fragmentos de entre 200-1 000 pb. Tras la sonicación, las muestras se centrifugaron a 10 000xg durante 10 minutos a 4°C para eliminar el material insoluble, y el sobrenadante de cada muestra se distribuyó en alícuotas de 50 μ L (equivalentes a la cromatina de 1×10^6 células, suficiente para llevar a cabo una reacción de inmunoprecipitación). Adicionalmente, se tomaron 5 μ L de cada muestra y se realizó

electroforesis en gel de agarosa para analizar la eficiencia de la fragmentación. Las alícuotas de cromatina entrecruzada y fragmentada se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Inmunoprecipitación de los complejos proteína-ADN

En primer lugar, se descongelaron en hielo las muestras de cromatina entrecruzada y fragmentada y, por cada reacción de inmunoprecipitación a realizar a partir de la misma muestra, se añadieron en un tubo 50 μL de cromatina y 450 μL de tampón de dilución conteniendo 2.25 μL de inhibidores de proteasas. En nuestro caso, se añadieron 150 μL de cromatina y 1 350 μL de tampón de dilución con 6.75 μL de antiproteasas. De cada una de las muestras diluidas se retiraron 5 μL (1%) de suspensión como "Input" que fueron almacenados a 4°C para su posterior utilización. El volumen restante se distribuyó en tres alícuotas de 495 μL para llevar a cabo tres reacciones de inmunoprecipitación. A la primera de estas alícuotas se le añadieron entre 1-10 μg del anticuerpo frente a la proteína de interés (dependiendo del anticuerpo). A la segunda de estas alícuotas se le añadió 1 μg de anti-ARN polimerasa II (control positivo) y, a la tercera se le añadió 1 μg de anti-IgG de ratón (control negativo). Además, se adicionaron 20 μL de suspensión de microesferas magnéticas recubiertas con proteína G a cada una de las alícuotas. A continuación, las muestras se incubaron durante 1 hora a 4°C con rotación vertical. Pasado este tiempo de incubación, se sedimentaron las microesferas magnéticas con ayuda del soporte magnético, se retiró el sobrenadante y se realizaron una serie de lavados consecutivos de los complejos microesfera-anticuerpo-cromatina con una serie de tampones proporcionados por el kit (*Low Salt Immune Complex Wash Buffer*, *High Salt Immune Complex Wash Buffer*, *LiCl Immune Complex Wash Buffer* y *TE Buffer*). Para llevar a cabo cada uno de estos lavados, se adicionaron 0.5 mL de tampón, se incubó durante 5 minutos en rotación y se sedimentaron las microesferas en el soporte magnético para retirar el tampón.

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

Tras sedimentar las microesferas y retirar el último tampón de lavado se añadieron a cada muestra 100 μL de *ChIP Elution Buffer* conteniendo 1 μL de proteinasa K y se incubaron las muestras a 62°C durante 2 horas con agitación. Por último, se incubaron las muestras a 95°C durante 10 minutos, se dejaron enfriar a temperatura ambiente, se sedimentaron las microesferas y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Mediante este proceso, se consigue disociar los complejos microesfera-proteína G-anticuerpo-proteína-ADN, de manera que tanto el anticuerpo utilizado como la proteína de interés y los fragmentos de ADN co-precipitados con ella quedan libres en disolución.

Purificación del ADN

Para la purificación de los fragmentos de ADN se utilizaron las columnas de filtración proporcionadas por el kit. En primer lugar, se adicionaron 0.5 mL de *Bind Reagent A* a los 100 μL de sobrenadante obtenido mediante el proceso de elución de cada una de las muestras, se agitaron los tubos y esta solución se transfirió a las columnas de purificación dispuestas sobre un tubo colector. Las columnas se centrifugaron a 10 000xg durante 30 segundos, se descartó el líquido eluido y se volvieron a colocar las columnas en el mismo tubo colector. Se adicionaron 500 μL de *Wash Reagent B* y se volvieron a centrifugar a 10 000xg durante 30 segundos, se descartó el líquido eluido y se volvieron a colocar las columnas en el mismo tubo colector. Seguidamente se sometieron las columnas a otra centrifugación a 10 000xg durante 30 segundos para eliminar los restos de líquido y

se descartaron tanto el líquido eluido como los tubos colectores y se colocaron las columnas en un nuevo tubo colector. Por último, se añadieron 50 μL de *Elution Buffer C* directamente en el centro de la columna y se centrifugaron a 10 000xg durante 30 segundos para eluir los fragmentos de ADN retenidos en la membrana del interior de la columna. Este ADN fue analizado inmediatamente o congelado a -20°C para su posterior análisis.

Análisis de los fragmentos de ADN mediante qPCR

El análisis de los fragmentos purificados se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR). Para ello, se emplearon *primers* que flanqueaban la secuencia del promotor del gen diana reconocida por el factor de transcripción de interés (E2F1, MITF, etc.), así como los *primers* control frente al promotor del gen GAPDH. En cada pocillo se añadieron 2 μL de muestra, 1 μL de mezcla de *primers forward* y *reverse* (10 μM), 12.5 μL de *SYBR Green Master Mix* y 9.5 μL de ddH₂O para completar hasta un volumen final de 25 μL . Cada muestra se cargó por triplicado y, una vez adicionados todos los reactivos a los pocillos, se selló la placa con un adhesivo especial (para evitar la evaporación durante el calentamiento) y se centrifugó a 1 500 rpm durante 1 minuto para reunir todos los reactivos en el fondo de los pocillos. Por último, se introdujo la placa en el termociclador *7500 Real Time PCR System* (Applied Biosystems) y se estableció el programa con las siguientes condiciones: una etapa de calentamiento inicial a 94°C (10 minutos) para activar a la Taq Hot Start ADN polimerasa, seguido de 50 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, y alineamiento y extensión a 62°C durante 1 minuto. Una vez terminada la amplificación, el programa realizó una serie de etapas para establecer la curva de desnaturalización del fragmento de ADN amplificado y determinar la T_m . Los datos obtenidos de la CHIP-qPCR fueron analizados mediante cuantificación relativa mediante la comparación del Ct del gen de estudio en cada una de las reacciones de inmunoprecipitación (con anti-ARN polimerasa II, anti-IgG y con el anticuerpo frente a la proteína de interés) con el Ct del gen de referencia (GAPDH) en el Input. Concretamente utilizamos el modelo matemático del delta Ct (ΔCt) para determinar el número de copias del gen de interés co-inmunoprecipitadas con la proteína de interés, respecto al número de copias del gen de referencia (GAPDH) en el Input, asumiendo que la eficiencia de amplificación de la PCR es del 100% para el gen en estudio y el de referencia.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gen de estudio}) - \text{Ct} (\text{GAPDH en el Input})$$

$$2^{-\Delta\text{Ct}} = \text{copias del gen de interés co-inmunoprecipitadas/copia de GAPDH en el Input}$$

3.4.8. ANÁLISIS DE DESOXIRRIBONUCLEOTIDOS TRIFOSFATO

Para determinar la cantidad de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) de una muestra se empleó un ensayo enzimático que utiliza oligonucleótidos sintéticos, con una secuencia definida, como cebadores para la reacción de la ADN polimerasa, la cual cataliza la incorporación de los dNTPs en el ADN. Cuando uno de los tres dNTPs presentes en exceso está marcado con radioactividad, la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN es proporcional a la cantidad del cuarto nucleótido, que es limitante. La sensibilidad se aumenta al diseñar los *primers* para que incorporen múltiples nucleótidos marcados por cada nucleótido limitante. Los ensayos de radioactividad se realizaron en la Sección de Radioprotección y Residuos de la Universidad de Murcia y las muestras se analizaron en un contador de centelleo beta Wallac Winspectral 1414 (Perkin-Elmer) (Figura 3.44).



Figura 3.44. Contador de centelleo beta Wallac Winspectral 1414.

Procedimiento:

Las células se sembraron en un frasco de cultivo de 75 cm² y se trataron con los compuestos deseados durante el tiempo necesario. Las células se recogieron mediante tripsinización después de cada periodo de incubación, se contaron y se lavaron 3 veces con PBS. A continuación, las células se centrifugaron y se extrajeron con 100 µL de ácido perclórico 0.4 N en hielo durante 20 minutos. Se centrifugaron a 15 000xg durante 1 minuto y el sobrenadante se neutralizó con 100 µL de una disolución 0.5 N de trioctilamina en 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Las fases se separaron por centrifugación a 16 000xg durante 2 minutos y se retiró la fase acuosa de la parte superior que se congeló rápidamente en una mezcla de hielo seco y etanol. Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su análisis. La mezcla para la reacción con la ADN Polimerasa (50 µL) contenía: HEPES 100 mM y MgCl₂ 10 mM (pH 7.5), 0.1 U de ADN Polimerasa I (fragmento Klenow) de *Escherichia coli* (Sigma), 0.25 µM de los oligonucleótidos cebadores, 1 µCi de [³H]dATP (American Radiolabeled Chemicals) o [³H]dTTP (Perkin-Elmer). La reacción empezó con la adición de la enzima y la mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, la mezcla de reacción se depositó en pequeños cuadrados de papel Whatman DE81. Los papeles se secaron, se lavaron tres veces durante 10 minutos con Na₂HPO₄ al 5% y se enjuagaron una vez con agua destilada y otra vez con etanol al 95%. Después, se secaron y la radioactividad de los papeles se determinó con el contador de centelleo beta Wallac Winspectral 1414. La concentración final de dNTPs se determinó mediante la comparación con las rectas de calibrado de estándares conocidos que habían sufrido el mismo proceso de análisis.

3.4.9. SILENCIAMIENTO GÉNICO MEDIANTE INTERFERENCIA POR ARN

La interferencia por ARN es un mecanismo de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia que está desencadenado por la aparición en la célula de moléculas de ARN de doble cadena. Se trata de un proceso característico de células eucariotas y tiene una gran importancia en procesos de desarrollo y diferenciación celular, cáncer y defensa frente a virus.

El mecanismo mejor caracterizado es aquel que se inicia con la presencia en la célula de moléculas largas de ARN de doble cadena (ARNdc). En el citoplasma, estas moléculas largas de ARNdc son reconocidas por la enzima Dicer que las fragmenta en pequeñas moléculas de ARNdc de entre 21 y 23 nucleótidos que presentan dos nucleótidos desemparejados en cada extremo 3' hidroxilo. Estas moléculas de ARN de interferencia se denominan ARNi o *siRNAs* (del Inglés, *small*

interfering RNAs) y constan de una hebra complementaria al ARNm diana, denominada **guía**, y de una hebra complementaria a la guía, denominada **pasajera**. Una vez que el ARNdc ha sido fragmentado, se produce el desenrollamiento de las dos hebras del ARNi y la degradación de la hebra pasajera por parte de la proteína Argonauta 2 (Ago2). Entonces, la hebra guía es incorporada a un complejo multiproteico conocido como RISC (del Inglés, *RNA Induced Silencing Complex*) y es utilizada como molde para reconocer a la molécula de ARNm diana. Si la complementariedad con la molécula de ARNm es perfecta, el complejo RISC degrada este ARNm. Si por el contrario la complementariedad no es perfecta, el complejo RISC no degrada el ARNm pero sí evita su unión al ribosoma. En cualquiera de los casos, se produce el silenciamiento del gen homólogo a la molécula de ARNi (Figura 3.45).

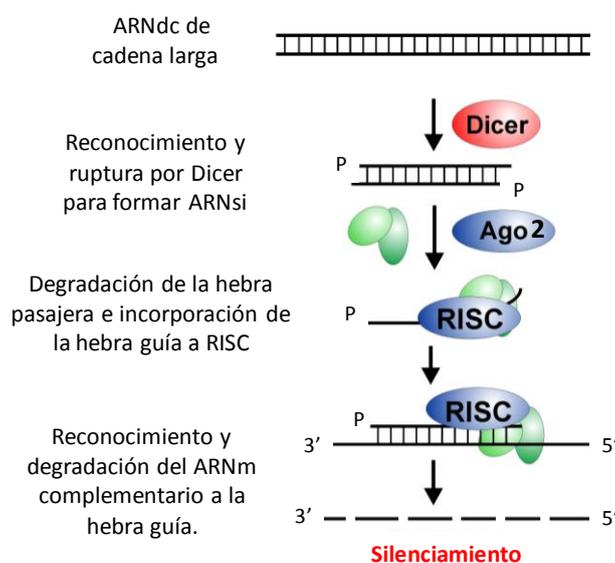


Figura 3.45. Mecanismo molecular de silenciamiento génico por ARN de interferencia.

El descubrimiento del mecanismo de interferencia por ARN ha proporcionado una poderosa herramienta molecular para el silenciamiento génico basada en la introducción en la célula, mediante métodos de transfección, de un ARNi homólogo al ARNm del gen cuya expresión se desea silenciar. Esta estrategia está siendo utilizada en la actualidad para el desarrollo de terapias génicas dirigidas a reducir la expresión de genes alterados o sobreexpresados en distintas enfermedades, pero sobre todo se está utilizando en investigación básica, para el estudio de la función génica, tanto en cultivos celulares *in vitro* como en modelos animales *in vivo*.

Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral se utilizó esta técnica de silenciamiento génico mediante ARN de interferencia para el estudio de la implicación de varios genes en el mecanismo de resistencia a diversas terapias contra el melanoma. Para los experimentos de transfección se utilizó el medio de cultivo bajo en suero Opti-MEM (Gibco) y el reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Como ARNs de interferencia se utilizaron *Stealth RNAi™ siRNAs* (Invitrogen) diseñados específicamente para el silenciamiento de los genes que deseábamos estudiar. Como controles negativos se utilizaron *Stealth™ RNAi Negative Control Duplex* (Invitrogen) con un contenido en GC bajo, medio o alto en función del porcentaje de GC del ARNi utilizado en cada caso.

Procedimiento:

Para los experimentos de silenciamiento se sembraron entre 1 000 y 2 000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en medio sin antibiótico y se dejaron crecer hasta que alcanzaron una confluencia cercana al 50%. Se preparó un volumen suficiente de mezcla de transfección para todos los pocillos que se deseaban silenciar con un mismo ARNi. Por cada pocillo a transfectar se preparó, por una parte, una mezcla de 0.675 μL de Lipofectamine 2000 y 25 μL de Opti-MEM y, por otra parte, una mezcla de 15 pmoles del ARNi correspondiente y 25 μL de Opti-MEM. Ambas mezclas se agitaron y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se adicionó todo el volumen de la mezcla que contenía Lipofectamine 2 000 sobre la mezcla que contenía el ARNi, se agitó suavemente y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de los pocillos y se añadieron 50 μL /pocillo de la mezcla de transfección y 100 μL /pocillo de medio de cultivo sin antibióticos, de manera que la concentración final de ARNi en el pocillo fuera de 100 nM. Las células se incubaron con la mezcla de transfección durante 24 horas y, pasado este tiempo, se sustituyó el medio de transfección por medio de cultivo sin antibióticos, o bien, por medio de cultivo sin antibióticos conteniendo los compuestos que se deseaban testar. El análisis de la eficacia del silenciamiento se realizó 48 horas después de la transfección mediante RT-qPCR y/o western blot. Para corroborar la especificidad en la transfección, se utilizó como control negativo el *Stealth™ RNAi Negative Control Duplex* más adecuado en función del porcentaje en GC del ARNi empleado para silenciar y, además, se establecieron controles sin transfectar para descartar posibles efectos debidos solamente a los reactivos de transfección.

3.5. ESTADÍSTICA

Los resultados de los experimentos recogidos en esta Memoria se expresan como la media \pm la desviación estándar (SD) de una serie de medidas comprendidas entre 2 y 10 repeticiones, dependiendo del experimento concreto.

En aquellos casos en los que los datos siguieron una distribución normal, la diferencia estadística entre distintos grupos experimentales se evaluó con el método paramétrico de la *t* de Student. En aquellos casos en los que los datos no siguieron una distribución normal, las diferencias entre las medianas de los distintos grupos se analizaron mediante el test no paramétrico de Mann Whitney. En ambos casos, se consideró la existencia de una diferencia significativa cuando $P < 0.05$.

En los experimentos de microscopía confocal, la colocalización de las distintas proteínas marcadas con anticuerpos unidos a fluorocromos se midió mediante el coeficiente de correlación de Pearson (*r*). Este método permitió determinar la fuerza de la relación lineal entre los valores de intensidad de fluorescencia de los pixeles homólogos de las imágenes correspondientes a cada fluorocromo. Éste índice de correlación *r* varía en el intervalo [-1, +1], siendo $r=1$ una correlación positiva perfecta; $0 < r < 1$ una correlación positiva; $r=0$ la no existencia de correlación; $-1 < r < 0$ una correlación negativa; y $r=-1$ una correlación negativa perfecta.

Durante la realización de esta Tesis Doctoral, se empleó además el ajuste de regresión lineal para la elaboración de las distintas rectas de calibrado. También se aplicó un ajuste de regresión lineal al incremento de absorbancia a 415 nm en función del tiempo para la determinación de la pendiente utilizada para el cálculo del Factor de Enriquecimiento Citosólico Nucleosomal en los ensayos de apoptosis, tal y como se indica en el apartado 3.2.2.1 de esta memoria.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SigmaPlot 10.0 y Microsoft Excel.

Forms of Cork in two different Sections. p. 10.

Fig:1.



CAPÍTULO 4

Fig: 2.



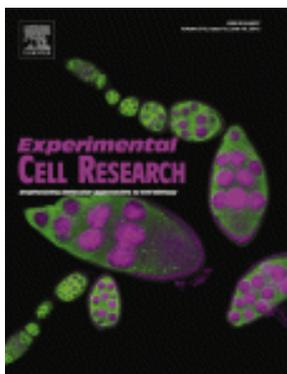
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*No podemos resolver los problemas
pensando de la misma forma que cuando
los creamos.*

Albert Einstein.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. EL MELANOMA COORDINA MECANISMOS GENERALES Y ESPECÍFICOS PARA PROMOVER LA RESISTENCIA AL METOTREXATO.



4.1.1. TÍTULO

Melanoma coordinates general and cell-specific mechanisms to promote methotrexate resistance.

4.1.2. AUTORES

Magalí Sáez-Ayala, María Piedad Fernández-Pérez, María F. Montenegro, Luis Sánchez-del-Campo, Soledad Chazarra, Antonio Piñero-Madrona, Juan Cabezas-Herrera y José Neptuno Rodríguez-López.

4.1.3. REFERENCIA

Experimental Cell Research (2012) **318** (10), 1146-1159.

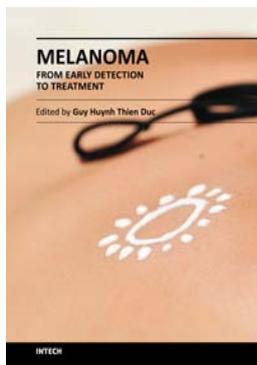
4.1.4. URL

<http://goo.gl/MTFVjD>

4.1.5. RESUMEN

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo y es altamente resistente frente a todas las terapias anticancerígenas disponibles en la actualidad, incluyendo el metotrexato (MTX). Recientemente, nuestro grupo de investigación ha propuesto un nuevo mecanismo de resistencia al MTX específico del melanoma según el cual, el secuestro de esta droga en los melanosomas y su exportación al exterior celular contribuirían a la resistencia del melanoma al MTX. En este artículo se describe cómo el melanoma coordina estos mecanismos específicos con mecanismos generales de resistencia al MTX para volverse extremadamente resistente al metotrexato. En concreto desvelamos que el factor de transcripción E2F1 y la quinasa Chk1, dos moléculas con funciones duales en supervivencia y apoptosis, juegan un papel esencial en la resistencia del melanoma al MTX. Nuestros resultados indican que el MTX estimula la actividad transcripcional de E2F1, el cual induce la expresión de dihidrofolato reductasa y timidilato sintasa que están implicadas en el metabolismo del ácido fólico y son necesarias para la progresión del ciclo celular de la fase G1 a S. La expresión de estas enzimas favorece la acumulación de dTTP, lo que promueve la formación de roturas de cadena sencilla en el ADN y la consiguiente activación de Chk1. Bajo estas condiciones, las células de melanoma quedan protegidas de la apoptosis debido a que Chk1 desencadena el arresto de su ciclo celular en fase S.

4.2. MECANISMOS MOLECULARES Y CELULARES DE RESISTENCIA AL METOTREXATO EN MELANOMA



4.2.1. TÍTULO

Cellular and molecular mechanisms of methotrexate resistance in melanoma.

4.2.2. AUTORES

Luís Sánchez-del-Campo, María F. Montenegro, Magalí Sáez-Ayala, María Piedad Fernández-Pérez, Juan Cabezas-Herrera y José Neptuno Rodríguez-López.

4.2.3. REFERENCIA

Melanoma – From Early Detection to Treatment (Ed., Guy Huynh Thien Duc) (2013) 392-409.

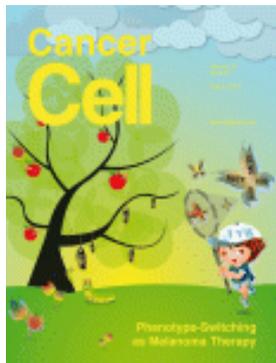
4.2.4. URL

<http://goo.gl/vhQGLK>

4.2.5. RESUMEN

Aunque el metotrexato (MTX) es un antifolato ampliamente utilizado en oncología clínica frente a diversos tipos de cáncer, no es efectivo frente al melanoma. Durante años, nuestro laboratorio se ha centrado en el estudio de las bases moleculares de la resistencia del melanoma al MTX con la finalidad de encontrar las claves moleculares que permitan vencer esta resistencia. Entre los mecanismos clásicos de resistencia a los antifolatos destacan una baja poliglutaminación, la pérdida de función del transportador de folatos reducidos (RFC) o el aumento de los niveles del enzima dihidrofolato reductasa (DHFR). Sin embargo, nuestros estudios han puesto de manifiesto la existencia de mecanismos específicos del melanoma, que actuarían de forma coordinada con estos mecanismos clásicos, para promover la alta resistencia al MTX observada en este tipo de cáncer. Entre estos mecanismos destaca la endocitosis del MTX mediada por el FR- α (*folate receptor α*) que conduce al secuestro de esta droga en los melanosomas y a su expulsión al exterior celular, reduciendo la acumulación de MTX intracelular. Esta baja concentración de MTX no es capaz de inducir apoptosis, pero sí de inducir la activación transitoria del factor de transcripción E2F1 que, a su vez, activa la expresión de genes como la DHFR y la timidilato sintasa (TS). Esto provoca un exceso de dTTP que causa estrés en las horquillas de replicación, con la consiguiente activación de ATR/Chk1. Esto explicaría el arresto del ciclo celular que protege a las células de melanoma de la apoptosis. El conocimiento de estos mecanismos de resistencia tiene importantes implicaciones terapéuticas ya que proporciona información acerca de cómo burlar estos mecanismos de resistencia mediante la intervención farmacológica de dianas moleculares implicadas en estos procesos.

4.3. EL CAMBIO FENOTÍPICO DIRIGIDO COMO UNA ESTRATEGIA EFECTIVA CONTRA EL MELANOMA



4.3.1. TÍTULO

Directed phenotype switching as an effective antimelanoma strategy.

4.3.2. AUTORES

Magalí Sáez-Ayala, María F. Montenegro, Luís Sánchez-del-Campo, María Piedad Fernández-Pérez, Soledad Chazarra, Rasmus Freter, Mark Middleton, Antonio Piñero-Madrona, Juan Cabezas-Herrera, Colin R. Goding y José Neptuno Rodríguez-López.

4.3.3. REFERENCIA

Cancer Cell (2013) **24** (1), 105 - 119.

4.3.4. URL

<http://goo.gl/N5r1yf>

4.3.5. RESUMEN

La resistencia del melanoma y otros cánceres a las distintas terapias anticancerígenas surge a partir de la existencia de distintas poblaciones de células tumorales con distintas propiedades biológicas. Esta heterogeneidad celular vendría determinada tanto por características genéticas irreversibles, como por rasgos fenotípicos dinámicos de las células tumorales. En este trabajo, empleamos como estrategia la inducción de un cambio fenotípico de las células de melanoma para sensibilizarlas frente a una terapia específica de este linaje celular. Nuestros resultados demuestran que el metotrexato (MTX) induce la expresión del factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) el cual, a su vez, inhibe la invasividad y promueve la expresión de genes de diferenciación melanocítica como el gen de la tirosinasa. En consecuencia, el MTX sensibiliza a las células de melanoma frente a una prodroga activada por la tirosinasa, el 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil(-)-epicatequina (TMECG), la cual inhibe a la enzima dihidrofolato reductasa con una alta afinidad. La combinación de MTX y TMECG conduce al agotamiento de las reservas de timidina celulares, produce roturas de doble cadena en el ADN e induce apoptosis mediada por E2F1, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, esta combinación de fármacos constituye una terapia efectiva contra el melanoma que actúa de forma dirigida sobre este tejido, al requerir activación del TMECG por la enzima tirosinasa. Además, esta combinación ha demostrado ser altamente eficaz frente al melanoma, independientemente de la presencia o no de mutaciones en los genes *BRAF*, *MEK* o *p53*.

4.4. SUPRESIÓN DE LA RESISTENCIA DEL MELANOMA A LOS ANTIFOLATOS MEDIANTE LA INTERVENCIÓN DE LA VÍA DE LA MIOSINA Va.



4.4.1. TÍTULO

Suppression of antifolate resistance by targeting the myosin Va pathway in melanoma.

4.4.2. AUTORES

María Piedad Fernández-Pérez; María F. Montenegro, Magalí Sáez-Ayala, Luís Sánchez-del-Campo, Antonio Piñero-Madrona, Juan Cabezas-Herrera y José Neptuno Rodríguez-López.

4.4.3. REFERENCIA

Neoplasia (2013) **15(7)**, 826 - 839.

4.4.4. URL

<http://goo.gl/6NTSCT>

4.4.5. RESUMEN

El melanoma supone un grave problema clínico debido a la gran resistencia mostrada por este tipo de cáncer frente a las distintas modalidades terapéuticas existentes en la actualidad. Por tanto, una de las principales prioridades para mejorar la terapia del melanoma es entender y prevenir los mecanismos de resistencia. Estudios recientes han puesto de manifiesto un mecanismo de resistencia específico de estas células frente a diversos agentes citotóxicos que consiste en el secuestro de estos fármacos en los melanosomas, seguido de su exportación al exterior celular. En concreto, nuestro grupo de investigación demostró que el tratamiento del melanoma con metotrexato (MTX) alteraba la melanogénesis y aceleraba la exportación de melanosomas. Sin embargo, los procesos celulares y moleculares por los cuales el MTX es atrapado en los melanosomas y exportado al exterior celular eran desconocidos. En este estudio, identificamos a la proteína motora Miosina Va (Myo Va) como un posible mediador de estos procesos celulares. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento del melanoma con MTX conduce a la fosforilación de la proteína MyoVa mediada por Akt2, lo cual aumenta su capacidad de interaccionar con los melanosomas y acelera su exportación. Para entender el mecanismo por el cual el MTX activa a Akt2, estudiamos los efectos de este fármaco sobre la actividad de la proteína fosfatasa 2A, una proteína que se activa por metilación de su subunidad catalítica y que normalmente desfosforila e inactiva a Akt. En conjunto, en este estudio identificamos una nueva vía de tráfico intracelular en melanoma que promueve la resistencia tumoral a través de la activación de Akt2/MyoVa. A raíz de estos hallazgos, exploramos varias combinaciones terapéuticas para incrementar la susceptibilidad del melanoma a este fármaco mediante el bloqueo farmacológico de la exportación de MTX secuestrado en los melanosomas.

4.5. COMO CONVERTIR LA RESISTENCIA EN EL TALÓN DE AQUILES DEL MELANOMA



4.5.1. TÍTULO

Cómo convertir la resistencia en el talón de Aquiles del melanoma.

4.5.2. AUTORES

María Piedad Fernández-Pérez, Luís Sánchez-del-Campo, Magalí Sáez-Ayala, María F. Montenegro, Soledad Chazarra y José Neptuno Rodríguez-López.

4.5.3. REFERENCIA

Eubacteria (2013) **32**, 58-63.

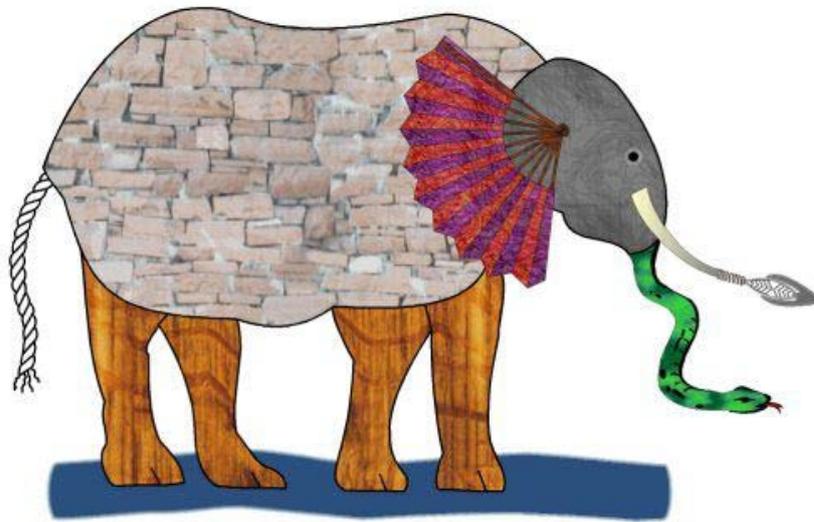
4.5.4. URL

http://www.um.es/eubacteria/resistencia_talon_aquiles_melanoma.pdf

4.5.5. RESUMEN

El melanoma cutáneo es un tipo de cáncer de piel que tiene su origen en los melanocitos epidérmicos que son las células responsables de dar coloración a la piel gracias a que sintetizan y almacenan melaninas en unos orgánulos especiales denominados melanosomas. Se trata del tipo de cáncer de piel más agresivo que muestra una alta resistencia frente a todas las terapias anticancerígenas disponibles en la actualidad, incluida la quimioterapia con metotrexato (MTX), un antifolato ampliamente utilizado en oncología clínica. Nuestro grupo de investigación descubrió un nuevo mecanismo de resistencia del melanoma al metotrexato según el cual el transporte de esta droga por endocitosis mediada por el FR- α (*folate receptor alpha*) conducía, de alguna manera, al secuestro del MTX en los melanosomas y a su exportación al exterior celular, lo cual reducía su acumulación intracelular y hacía que únicamente tuviera un efecto citoestático en lugar de citotóxico sobre las células de melanoma. Así, el MTX parecía estar activando la biogénesis y el transporte de melanosomas, dos rasgos indicativos de diferenciación melanocítica, pero los mecanismos por los cuales este fármaco mediaba estos efectos eran desconocidos. Nuestros estudios pusieron de manifiesto que el metotrexato activa la biogénesis de melanosomas y la síntesis de melanina a través de la inducción de la expresión del factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*), una proteína clave que regula los procesos de diferenciación, supervivencia y proliferación melanocítica. Entre los genes de diferenciación inducidos por MITF se incluyen enzimas implicadas en la síntesis de melanina como la tirosinasa, proteínas estructurales del melanosoma como PMEL17 y proteínas implicadas en el transporte como Rab-27A. Este descubrimiento abrió la puerta al desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas contra dianas moleculares implicadas en el proceso.

Entre estas estrategias destacan el uso de una prodroga con actividad antifolato activada por tirosinasa específicamente en células de melanoma y el bloqueo farmacológico de la ruta de transporte melanosomal para evitar la expulsión de metotrexato. Ambas terapias han mostrado excelentes resultados pre-clínicos que resultan esperanzadores para el tratamiento del melanoma en estadios avanzados para el que, a día de hoy, no existe una terapia efectiva.



CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

*La verdad no cambia porque sea, o no
sea, creída por la mayoría de las
personas.*

Hipatia de Alejandría.

5. CONCLUSIONES.

1. Methotrexate (MTX) stimulates a transient activation of E2F1, which induces dTTP accumulation through the expression of DHFR and TS, two E2F1 target genes involved in folate metabolism and required for G1-S progression.
2. The dTTP excess following MTX treatment induces a nucleotide imbalance which promotes replication fork stress and the subsequent activation of ATR/Chk1 checkpoint pathway, which causes an early S-phase arrest that, protects melanoma cells from MTX-induced apoptosis.
3. The abrogation of the ATR/Chk1 cell cycle checkpoint through either *CHEK1* silencing or Chk1 pharmacological blockade with UCN-01 sensitizes melanoma cells to MTX-induced apoptosis independently of p53 status, so that could represent an effective strategy to overcome MTX resistance in melanoma.
4. MTX stimulates Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expression which activates the differentiation program in melanoma cells through the induction of genes involved in melanosome biogenesis (*MART1*, *PMEL17*), melanin synthesis (*TYR*, *TYRP1*) and melanosome transport (*RAB27A*).
5. Accumulation of MITF and, the consequent increased melanosome biogenesis observed after MTX treatment, constitute the molecular basis of the melanoma-specific mechanism of resistance to MTX mediated by melanosomal MTX sequestration and export.
6. Despite promoting the melanosome-mediated mechanism of resistance, the elevation of MITF following MTX treatment has an important advantage: it drives heterogeneous populations of melanoma cells to a differentiated phenotype that eradicates invasive cells within the tumor.
7. Differentiation induced by MTX treatment also sensitizes melanoma cells to the TYR-activated antifolate prodrug 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin (TMECG). The combination of MTX and TMECG leads to depletion of dTTP pools, double strand DNA breaks and a highly efficient E2F1-mediated apoptosis in a cell type-specific fashion, irrespective of *BRAF*, *MEK* or *TP53* status.
8. The combination of MTX and TMECG acts synergistically to inhibit tumor growth and to reduce the number and the size of metastasis *in vivo*. Importantly, this combination therapy appear not to induce the acquisition of resistance after *in vivo* treatment, and it does not cause any deleterious effect on non-melanoma TYR- and MITF-positive cells such as normal skin melanocytes or the pigmented eye epithelia of the retina and iris.
9. The activation of melanosome transport following MTX treatment is mediated by the activation of the motor protein Myosin Va (MyoVa) promoted by Akt2 phosphorylation.

Akt activation is, in turn, mediated by the inactivation of the protein phosphatase PP2A due to the lack of methylation of its catalytic subunit (which is necessary for PP2A to be active) under the demethylating effects of MTX.

- 10.** UCN-01-mediated inhibition of Akt/MyoVa trafficking pathway avoids melanosome transport and, consequently, allows the blockade of MTX export in melanoma cells. The treatment of melanoma cells with MTX and UCN-01 favored dTTP depletion, double strand DNA breaks and apoptosis mediated by E2F1 in a p73-dependent and p53 independent fashion.
- 11.** MTX/UCN-01 combination is highly effective also *in vivo*, and it is not only able to reduce the primary tumor burden, but also to reduce the number and size of portal-type liver metastasis and to eliminate sinusoidal-type metastasis.



RESUMEN

*Y como no sabía que era
imposible, lo hice.*

Albert Einstein.

6. RESUMEN

6.1. MOLECULAR BASIS OF MELANOMA RESISTANCE TO ANTIFOLATES: DESIGN OF NEW THERAPEUTIC STRATEGIES

Melanoma is the most aggressive form of skin cancer and it is highly resistant to all current modalities of cancer therapy, including cytotoxic drugs as methotrexate (MTX), an antifolate widely used in clinical oncology against many cancer types. Recently, our lab discovered a new melanoma-specific mechanism of MTX resistance by which folate receptor α (FR- α)–mediated endocytotic transport of MTX facilitates melanosomal drug sequestration and cellular export in melanoma cells, thereby reducing the accumulation of MTX in intracellular compartments. That low MTX intracellular concentration is just able to induce cell growth arrest, but not cell death in melanoma cells. Particularly, we found that melanoma treatment with MTX induces cell cycle arrest without inducing apoptosis, activates melanin synthesis and melanosome biogenesis, and accelerates melanosomal export; but the cellular and molecular processes by which MTX mediates all these effects had not been elucidated.

The **Main Objective** of the present PhD Thesis was the identification of the molecular basis of the cell cycle arrest, the activation of melanogenesis and the acceleration of melanosome transport induced by MTX treatment that, collectively, protect melanoma cells against MTX-induced apoptosis. The **Secondary Objective**, was the development of new therapeutic strategies combining MTX with drugs directed against molecular targets that are key components of the mechanisms of melanoma resistance to MTX.

To achieve those objectives we used several **experimental models**, including melanoma and non melanoma cell lines, an artificial skin melanoma model, and mice melanoma xenografts. We employed a battery of **cell biology techniques** (viability, apoptosis and migration assays; electronic and optical microscopy; flow cytometry; immunohistochemistry, immunofluorescence, etc.); **biochemistry techniques** (western blotting, protein immunoprecipitation, mass spectrometry, enzymatic activity determination by UV-VIS spectroscopy, etc.); **molecular biology techniques** (nucleic acid extraction, PCR, RT-qPCR, chromatin immunoprecipitation, etc.). The results of the implementation of these techniques were subjected to the appropriate **statistical tests**.

Since the ability of cells to delay cell cycle progression and halt DNA synthesis represents a defensive mechanism that spares potential toxicity, firstly we focused on deciphering the molecular basis of the MTX-induced cell cycle arrest. We identified the transcription factor E2F1 and the checkpoint kinase 1 (Chk1) as key mediators of this mechanism of resistance. The results indicated that MTX stimulated the transcriptional activity of E2F1 on the promoters of dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidylate synthase (TS), which lead to an increase in the dTTP levels, instead of dTTP depletion as occurs in MTX-sensible cells. Since dTTP is an allosteric inhibitor of ribonucleotide reductase, which is necessary for the synthesis of all the dNTPs, dTTP excess induced DNA replication fork stress that activates the ATR/Chk1 DNA damage signaling pathway. Under these conditions, melanoma cells were protected from apoptosis by arresting their cell cycle in early S-phase. However, abrogation of this checkpoint

by *CHEK1* silencing or by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine)-mediated Chk1 inhibition, rapidly triggered MTX-induced cell death, suggesting that inhibition of Chk1 in combination with this kind of antimetabolite chemotherapy is a viable therapeutic strategy to overcome melanoma resistance.

Secondly, we focused on the study of the activation of melanogenesis observed after MTX treatment. Our results showed that Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) that normally acts as a master regulator of melanocyte development, function and survival, is responsible for the activation of melanogenesis in melanoma after MTX treatment. In fact, MTX treatment increases the expression of this transcription factor which in turn induces the expression of melanocytic differentiation genes driving melanin production and melanosome biogenesis as tyrosinase (*TYR*). The increased *TYR* expression in response to MTX-mediated MITF activation provided an opportunity to design a two step strategy consisting in the combination of MTX with a prodrug that our group had previously designed to be activated by TYR. This prodrug is a compound called 3-O-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin (TMECG) that inhibits the enzyme DHFR with high affinity. The combination of MTX and TMECG was able to induce depletion of thymidine pools, double-strand DNA breaks, and highly efficient E2F1-mediated apoptosis *in vitro* and *in vivo*. Recently, it has been recognized that MITF acts as a melanoma rheostat in determining tumor subpopulation identity. In melanomas, reduced MITF expression leads to G1 arrested, invasive cells with stem-like properties including the ability to initiate tumors with high efficiency. By contrast, elevated MITF leads to activation of differentiation genes. In between, intermediate levels of MITF allow the proliferation of melanoma cells. Consequently, tumors comprise a mix of MITF-positive and negative melanoma cells. Therefore, the increase of MITF expression by MTX treatment would drive heterogeneous populations of tumor cells to a differentiated and less invasive phenotype and, at the same time, would sensitize these differentiated cells to the TYR-processed prodrug TMECG in a cell-specific fashion.

In a different approach, we explored the molecular basis of the activation of the transport of melanosomes observed after MTX treatment with the aim of designing a therapeutic strategy driven to block the MTX export within melanosomes. We identified a new MTX-activated molecular pathway involved in the export of melanosomes, in which the motor protein MyosinVa (MyoVa) plays a key role. Our results demonstrated that melanoma treatment with MTX leads to Akt2-dependent MyoVa phosphorylation, which enhances its ability to interact with melanosomes and accelerates their exportation. Due to these findings, we designed a combined therapy driven to block this MyoVa/Akt2 pathway. Because UCN-01 is also a potent inhibitor of PDK1, which activates Akt by phosphorylation, we hypothesized that the inhibition of this Akt2 phosphorylation by UCN-01 may result in the disruption of MTX stimulated melanosome transport. In fact, MTX/UCN-01 combined therapy prevented MTX export by blocking melanosome transport and was able to induce a highly efficient E2F1-mediated apoptosis in culture and *in vivo*. In summary, we observed that the combination of MTX and UCN-01 may represent a therapeutic option for the treatment of this evasive disease.

6.2. BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA DEL MELANOMA A LOS ANTIFOLATOS: DISEÑO DE NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

El melanoma es el tipo de cáncer de piel más agresivo y muestra una alta resistencia frente a todas las terapias anticancerígenas disponibles en la actualidad, incluyendo agentes citotóxicos como el metotrexato (MTX), un antifolato ampliamente utilizado en oncología clínica. Recientemente, nuestro laboratorio ha descubierto un nuevo mecanismo de resistencia al MTX específico de las células de melanoma por el cual, la endocitosis de esta droga mediada por el receptor de folato (FR- α) conduce al secuestro del MTX en los melanosomas y a su expulsión al exterior celular, reduciendo así la acumulación de esta droga en los compartimentos intracelulares. Esta baja concentración de MTX en el interior celular es capaz únicamente de inducir un arresto del crecimiento, pero no de inducir la muerte de las células de melanoma. Por tanto, se sabía que el tratamiento con MTX es capaz de inducir arresto del ciclo celular sin inducir apoptosis, de activar la síntesis de melanina y la biogénesis de melanosomas, y de acelerar el transporte de melanosomas, pero los mecanismos celulares y moleculares por los cuales el MTX mediaba estos efectos era desconocido.

El **Objetivo Principal** de esta Tesis Doctoral fue la identificación de las bases moleculares del arresto del ciclo celular, de la activación de la melanogénesis y de la aceleración del transporte melanosomal inducidos por el tratamiento con MTX que, en conjunto, protegen a las células de melanoma de la apoptosis inducida por el MTX. El **Objetivo Secundario** fue el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas combinando el MTX con agentes dirigidos frente a dianas moleculares clave en los mecanismos de resistencia.

Para lograr estos objetivos empleamos, como **modelos experimentales**, varias líneas celulares de melanoma y de otros tipos de cáncer, un modelo de melanoma de piel artificial y un modelo de xenoinjerto de melanoma en ratón. Además, empleamos una batería de **técnicas de biología celular** (ensayos de viabilidad, apoptosis y migración; microscopía óptica y electrónica; inmunohistoquímica; inmunofluorescencia, etc.); **técnicas de bioquímica** (*western blot*, inmunoprecipitación de proteínas, espectrometría de masas, determinación de actividad enzimática mediante espectroscopía UV-VIS, etc.); **técnicas de biología molecular** (extracción de ácidos nucleicos, PCR, RT-qPCR, inmunoprecipitación de cromatina, etc.) Los resultados de la implementación de las citadas técnicas se sometieron a las **pruebas estadísticas** apropiadas.

Dado que se ha descrito que la capacidad de las células de detener la síntesis de ADN constituye un mecanismo de defensa que evita posibles daños, en primer lugar nos centramos en descifrar las bases moleculares del arresto del ciclo celular inducido por el MTX. Así, identificamos al factor de transcripción E2F1 y a la quinasa Chk1 como mediadores de este mecanismo de resistencia. Nuestros resultados demostraron que el tratamiento con MTX estimulaba la actividad transcripcional de E2F1 sobre los promotores de los genes de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y la timidilato sintasa (TS). Esto conducía a un incremento en los niveles de dTTP, en lugar de a una depleción de dTTP, como ocurre en células sensibles al MTX. Puesto que el dTTP es un inhibidor alostérico de la ribonucleótido reductasa que es necesaria para la síntesis de todos los dNTPs, este exceso de dTTP inducía un estrés en las horquillas de replicación capaz de activar la vía de señalización del daño al ADN mediada por ATR/Chk1. En estas condiciones, las células de melanoma evitan la apoptosis mediante el

arresto de su ciclo celular al inicio de la fase S. Sin embargo, la eliminación de este *checkpoint* mediante el silenciamiento genético de *CHEK1* o mediante la inhibición de esta quinasa con UCN-01 (7-hidroxiestaurosporina) tras el tratamiento con MTX desencadena rápidamente la muerte celular, sugiriendo que la inhibición de Chk1 en combinación con este tipo de antimetabolitos es una estrategia terapéutica eficaz para vencer la resistencia del melanoma.

En segundo lugar, nos centramos en el estudio de la activación de la melanogénesis por el MTX. Nuestros resultados demostraron que el factor de transcripción MITF (*Microphthalmia-associated transcription factor*) que, en melanocitos normales actúa como un regulador clave del desarrollo, función y supervivencia, era el responsable de la activación de la melanogénesis tras el tratamiento con MTX. De hecho, el MTX incrementa la expresión de este factor de transcripción el cual, a su vez, induce la expresión de genes implicados en la diferenciación melanocítica que conducen a la producción de melanina, como la enzima tirosinasa (TYR), y a la biogénesis de melanosomas. Este aumento en la expresión de TYR en respuesta a la activación de MITF mediada por MTX nos permitió diseñar una estrategia terapéutica basada en la combinación de MTX con una prodroga activada por TYR que había sido sintetizada previamente en nuestro laboratorio. Esta prodroga es el compuesto denominado 3-O-(3,4,5-trimetoxibenzoil)-(-)-epicatequina (TMECG), capaz de inhibir a la enzima DHFR con una alta afinidad. La combinación MTX/TMECG fue capaz de inducir el agotamiento de las reservas de timidina, roturas de doble cadena en el ADN y la apoptosis mediada por E2F1 con una alta eficacia, tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente se ha descrito que MITF actúa como un reóstato en melanoma, determinando la identidad de las distintas subpoblaciones tumorales. Según este modelo, bajos niveles de MITF dan lugar a células arrestadas en G1, altamente invasivas con propiedades de célula madre, incluyendo una alta capacidad de iniciar tumores. Por el contrario, niveles elevados de MITF conducen a la activación de genes de diferenciación. Entre ambos, niveles intermedios de MITF permiten la proliferación de las células de melanoma. En consecuencia, los tumores suponen una mezcla de células con distintos niveles de MITF. Por tanto, el aumento de la expresión de MITF por el tratamiento con MTX conduciría a las poblaciones heterogéneas de células tumorales hacia un fenotipo común, diferenciado y menos invasivo, y, al mismo tiempo, sensibilizaría a estas células diferenciadas a una prodroga activada por TYR como el TMECG.

En una aproximación diferente, estudiamos las bases moleculares de la activación del transporte de melanosomas inducida por el tratamiento con MTX. En este sentido, identificamos una nueva vía molecular implicada en la exportación de melanosomas en la que juega un papel esencial la proteína motora Miosina Va (MyoVa). Nuestros resultados demostraron que el tratamiento del melanoma con MTX conduce a una fosforilación de MyoVa mediada por Akt2 que incrementa la capacidad de esta proteína de interaccionar con los melanosomas y acelera su exportación. En vista de estos hallazgos, diseñamos una terapia combinada encaminada a bloquear la activación del transporte mediada por esta vía. Dado que se ha descrito que el UCN-01 es un potente inhibidor de PDK1, la cual activa a Akt por fosforilación, diseñamos una terapia de MTX combinado con UCN-01 para bloquear el transporte melanosomal. Efectivamente, la terapia combinada MTX/UCN-01 logró evitar la exportación de MTX mediante el bloqueo del transporte melanosomal y fue capaz de inducir la apoptosis mediada por E2F1 con una alta eficiencia tanto *in vitro* como *in vivo*.



BIBLIOGRAFÍA

La Historia se repite, pero la Ciencia

reverbera.

Siddhartha Mukherjee.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, N.R., Shaw, H.M., Rigel, D.S., Friedman, R.J., McCarthy, W.H., Osman, I., Kopf, A.W., and Polsky, D. (2004). Early diagnosis of cutaneous melanoma: revisiting the ABCD criteria. *JAMA* 292, 2771-2776.
- Ackermann, J., Fruttschi, M., Kaloulis, K., McKee, T., Trumpp, A., and Beermann, F. (2005). Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background. *Cancer Res* 65, 4005-4011.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Ahn, J.Y., Li, X., Davis, H.L., and Canman, C.E. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the Chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem* 277, 19389-19395.
- Akinaga, S., Gomi, K., Morimoto, M., Tamaoki, T., and Okabe, M. (1991). Antitumor activity of UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C, in murine and human tumor models. *Cancer Res* 51, 4888-4892.
- Akiyama, T., Yoshida, T., Tsujita, T., Shimizu, M., Mizukami, T., Okabe, M., and Akinaga, S. (1997). G1 phase accumulation induced by UCN-01 is associated with dephosphorylation of Rb and CDK2 proteins as well as induction of CDK inhibitor p21/Cip1/WAF1/Sdi1 in p53-mutated human epidermoid carcinoma A431 cells. *Cancer Res* 57, 1495-1501.
- Albrecht, A.M., Biedler, J.L., and Hutchison, D.J. (1972). Two different species of dihydrofolate reductase in mammalian cells differentially resistant to amethopterin and methasquin. *Cancer Res* 32, 1539-1546.
- Allegra, C.J., Chabner, B.A., Drake, J.C., Lutz, R., Rodbard, D., and Jolivet, J. (1985). Enhanced inhibition of thymidylate synthase by methotrexate polyglutamates. *J Biol Chem* 260, 9720-9726.
- Allegra, C.J., Hoang, K., Yeh, G.C., Drake, J.C., and Baram, J. (1987). Evidence for direct inhibition of de novo purine synthesis in human MCF-7 breast cells as a principal mode of metabolic inhibition by methotrexate. *J Biol Chem* 262, 13520-13526.
- Alt, F.W., Kellems, R.E., Bertino, J.R., and Schimke, R.T. (1978). Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. *J Biol Chem* 253, 1357-1370.
- Aoude, L.G., Wadt, K.A., Pritchard, A.L., and Hayward, N.K. (2015). Genetics of familial melanoma: 20 years after CDKN2A. *Pigment Cell Melanoma Res* 28, 148-160.
- Aranda, F., Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2, e26621.

- Arcaro, A., and Guerreiro, A.S. (2007). The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics* 8, 271-306.
- Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* 31, 9-18.
- Assaraf, Y.G. (2007). Molecular basis of antifolate resistance. *Cancer Metastasis Rev* 26, 153-181.
- Assaraf, Y.G., and Schimke, R.T. (1987). Identification of methotrexate transport deficiency in mammalian cells using fluoresceinated methotrexate and flow cytometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 7154-7158.
- Atkins, M.B., Lotze, M.T., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., *et al.* (1999). High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 17, 2105-2116.
- Avril, M.F., Aamdal, S., Grob, J.J., Hauschild, A., Mohr, P., Bonerandi, J.J., Weichenthal, M., Neuber, K., Bieber, T., Gilde, K., *et al.* (2004). Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J Clin Oncol* 22, 1118-1125.
- Baggott, J.E., Morgan, S.L., Ha, T., Vaughn, W.H., and Hine, R.J. (1992). Inhibition of folate-dependent enzymes by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem J* 282 (Pt 1), 197-202.
- Baggott, J.E., Vaughn, W.H., and Hudson, B.B. (1986). Inhibition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide transformylase, adenosine deaminase and 5'-adenylate deaminase by polyglutamates of methotrexate and oxidized folates and by 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside and ribotide. *Biochem J* 236, 193-200.
- Bahadoran, P., Busca, R., Chiaverini, C., Westbroek, W., Lambert, J., Bille, K., Valony, G., Fukuda, M., Naeyaert, J.M., Ortonne, J.P., *et al.* (2003). Characterization of the molecular defects in Rab27a, caused by RAB27A missense mutations found in patients with Griscelli syndrome. *J Biol Chem* 278, 11386-11392.
- Bajetta, E., Del Vecchio, M., Bernard-Marty, C., Vitali, M., Buzzoni, R., Rixe, O., Nova, P., Aglione, S., Taillibert, S., and Khayat, D. (2002). Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin Oncol* 29, 427-445.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421, 499-506.
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Kirkwood, J.M., *et al.* (2001). Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19, 3635-3648.
- Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 15, 102-111.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss,

- Y., Shiloh, Y., *et al.* (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* 281, 1674-1677.
- Barak, Y., Gottlieb, E., Juven-Gershon, T., and Oren, M. (1994). Regulation of mdm2 expression by p53: alternative promoters produce transcripts with nonidentical translation potential. *Genes Dev* 8, 1739-1749.
- Barbacid, M. (1987). ras genes. *Annu Rev Biochem* 56, 779-827.
- Barral, D.C., and Seabra, M.C. (2004). The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res* 17, 111-118.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* 13, 738-747.
- Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421-429.
- Basrur, V., Yang, F., Kushimoto, T., Higashimoto, Y., Yasumoto, K., Valencia, J., Muller, J., Vieira, W.D., Watabe, H., Shabanowitz, J., *et al.* (2003). Proteomic analysis of early melanosomes: identification of novel melanosomal proteins. *J Proteome Res* 2, 69-79.
- Bataille, V., and de Vries, E. (2008). Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention. *BMJ* 337, a2249.
- Bates, S., Phillips, A.C., Clark, P.A., Stott, F., Peters, G., Ludwig, R.L., and Vousden, K.H. (1998). p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-125.
- Baudino, T.A., McKay, C., Penderville-Samain, H., Nilsson, J.A., Maclean, K.H., White, E.L., Davis, A.C., Ihle, J.N., and Cleveland, J.L. (2002). c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev* 16, 2530-2543.
- Beadling, C., Jacobson-Dunlop, E., Hodi, F.S., Le, C., Warrick, A., Patterson, J., Town, A., Harlow, A., Cruz, F., Azar, S., *et al.* (2008). KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 14, 6821-6828.
- Bedikian, A.Y., Millward, M., Pehamberger, H., Conry, R., Gore, M., Trefzer, U., Pavlick, A.C., DeConti, R., Hersh, E.M., Hersey, P., *et al.* (2006). Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol* 24, 4738-4745.
- Begg, C.B., Orlow, I., Hummer, A.J., Armstrong, B.K., Krickler, A., Marrett, L.D., Millikan, R.C., Gruber, S.B., Anton-Culver, H., Zanetti, R., *et al.* (2005). Lifetime risk of melanoma in CDKN2A mutation carriers in a population-based sample. *J Natl Cancer Inst* 97, 1507-1515.
- Bell, D.J., Nyirongo, S.K., Mukaka, M., Zijlstra, E.E., Plowe, C.V., Molyneux, M.E., Ward, S.A., and Winstanley, P.A. (2008). Sulfadoxine-pyrimethamine-based combinations for malaria: a randomised blinded trial to compare efficacy, safety and selection of resistance in Malawi. *PLoS One* 3, e1578.

- Berdasco, M., and Esteller, M. (2010). Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry. *Dev Cell* 19, 698-711.
- Bertino, and J.R. (2000). Methotrexate: historical aspects. In *Methotrexate*, B.J.R.E. Cronstein B.N., ed. (Basel: Birkhäuser: Deutsche Bibliothek), pp. 1-8.
- Besaratinia, A., and Pfeifer, G.P. (2006). Investigating human cancer etiology by DNA lesion footprinting and mutagenicity analysis. *Carcinogenesis* 27, 1526-1537.
- Bhatia, S., Tykodi, S.S., and Thompson, J.A. (2009). Treatment of metastatic melanoma: an overview. *Oncology (Williston Park)* 23, 488-496.
- Birck, A., Ahrenkiel, V., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., and Guldberg, P. (2000). Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies. *J Invest Dermatol* 114, 277-280.
- Bishop, D.T., Demenais, F., Goldstein, A.M., Bergman, W., Bishop, J.N., Bressac-de Paillerets, B., Chompret, A., Ghorzo, P., Gruis, N., Hansson, J., *et al.* (2002). Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst* 94, 894-903.
- Bizarro, J.C., Feldmann, J., Castro, F.A., Ménasché, G., Jacob, C.M., Cristofani, L., Casella, E.B., Voltarelli, J.C., de Saint-Basile, G., and Espreafico, E.M. (2004). Griscelli syndrome: characterization of a new mutation and rescue of T-cytotoxic activity by retroviral transfer of RAB27A gene. *J Clin Immunol* 24, 397-410.
- Blakley, R.L. (1969). *The Biochemistry of Folic Acid and Related Pteridines* (New York).
- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., and Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 345, e4757.
- Brabletz, T., Jung, A., Reu, S., Porzner, M., Hlubek, F., Kunz-Schughart, L.A., Knuechel, R., and Kirchner, T. (2001). Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10356-10361.
- Branda, R.F., McCormack, J.J., Perlmutter, C.A., Mathews, L.A., and Robison, S.H. (1988). Effects of folate deficiency on the metastatic potential of murine melanoma cells. *Cancer Res* 48, 4529-4534.
- Brigle, K.E., Spinella, M.J., Sierra, E.E., and Goldman, I.D. (1995). Characterization of a mutation in the reduced folate carrier in a transport defective L1210 murine leukemia cell line. *J Biol Chem* 270, 22974-22979.
- Bryan, T.M., and Cech, T.R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11, 318-324.
- Burkhardt, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 8, 671-682.
- Bystroff, C., and Kraut, J. (1991a). Crystal structure of unliganded *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding. *Biochemistry* 30,

2227-2239.

Bystroff, C., and Kraut, J. (1991b). Crystal structure of unliganded *Escherichia coli* dihydrofolate reductase. Ligand-induced conformational changes and cooperativity in binding. *Biochemistry* 30, 2227-2239.

Cadet, J., Sage, E., and Douki, T. (2005). Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571, 3-17.

Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 729-740.

Canman, C.E., Lim, D.S., Cimprich, K.A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M.B., and Siliciano, J.D. (1998). Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 281, 1677-1679.

Cao, Y., and Cao, R. (1999). Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature* 398, 381.

Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* 69 Suppl 3, 4-10.

Carreira, S., Goodall, J., Aksan, I., La Rocca, S.A., Galibert, M.D., Denat, L., Larue, L., and Goding, C.R. (2005). Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature* 433, 764-769.

Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K.S., Testori, A., Larue, L., and Goding, C.R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev* 20, 3426-3439.

Castresana, J.S., Rubio, M.P., Vázquez, J.J., Idoate, M., Sober, A.J., Seizinger, B.R., and Barnhill, R.L. (1993). Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. *Int J Cancer* 55, 562-565.

Cavallaro, U., and Christofori, G. (2004). Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 118-132.

Chang, D.L., Qiu, W., Ying, H., Zhang, Y., Chen, C.Y., and Xiao, Z.X. (2007). ARF promotes accumulation of retinoblastoma protein through inhibition of MDM2. *Oncogene* 26, 4627-4634.

Chang, K.L., and Folpe, A.L. (2001). Diagnostic utility of microphthalmia transcription factor in malignant melanoma and other tumors. *Adv Anat Pathol* 8, 273-275.

Chehab, N.H., Malikzay, A., Stavridi, E.S., and Halazonetis, T.D. (1999). Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13777-13782.

Cheli, Y., Giuliano, S., Guiliano, S., Botton, T., Rocchi, S., Hofman, V., Hofman, P., Bahadoran, P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2011). Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene* 30, 2307-2318.

Chen, K.G., Valencia, J.C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J.K., Rouzaud, F., Berens, W., Wincovitch, S.M.,

- Garfield, S.H., Leapman, R.D., *et al.* (2006). Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9903-9907.
- Chen, M.J., Shimada, T., Moulton, A.D., Cline, A., Humphries, R.K., Maizel, J., and Nienhuis, A.W. (1984). The functional human dihydrofolate reductase gene. *J Biol Chem* 259, 3933-3943.
- Chen, Y.Q., Kraut, J., Blakley, R.L., and Callender, R. (1994). Determination by Raman spectroscopy of the pKa of N5 of dihydrofolate bound to dihydrofolate reductase: mechanistic implications. *Biochemistry* 33, 7021-7026.
- Cheney, R.E., O'Shea, M.K., Heuser, J.E., Coelho, M.V., Wolenski, J.S., Espreafico, E.M., Forscher, P., Larson, R.E., and Mooseker, M.S. (1993). Brain myosin-V is a two-headed unconventional myosin with motor activity. *Cell* 75, 13-23.
- Chi, A., Valencia, J.C., Hu, Z.Z., Watabe, H., Yamaguchi, H., Mangini, N.J., Huang, H., Canfield, V.A., Cheng, K.C., Yang, F., *et al.* (2006). Proteomic and bioinformatic characterization of the biogenesis and function of melanosomes. *J Proteome Res* 5, 3135-3144.
- Chiaverini, C., Beuret, L., Flori, E., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Bahadoran, P., Ortonne, J.P., Bertolotto, C., and Ballotti, R. (2008). Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport. *J Biol Chem* 283, 12635-12642.
- Chin, L. (2003). The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 3, 559-570.
- Cho, S.H., Toouli, C.D., Fujii, G.H., Crain, C., and Parry, D. (2005). Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* 4, 131-139.
- Chyu, K.Y., Babbidge, S.M., Zhao, X., Dandillaya, R., Rietveld, A.G., Yano, J., Dimayuga, P., Cercek, B., and Shah, P.K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. *Circulation* 109, 2448-2453.
- Cocco, L., Roth, B., Temple, C., Montgomery, J.A., London, R.E., and Blakley, R.L. (1983). Protonated state of methotrexate, trimethoprim, and pyrimethamine bound to dihydrofolate reductase. *Arch Biochem Biophys* 226, 567-577.
- Cody, V., Luft, J.R., Pangborn, W., Gangjee, A., and Queener, S.F. (2004). Structure determination of tetrahydroquinazoline antifolates in complex with human and *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase: correlations between enzyme selectivity and stereochemistry. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60, 646-655.
- Coghlin, C., and Murray, G.I. (2010). Current and emerging concepts in tumour metastasis. *J Pathol* 222, 1-15.
- Coleman, K.G., Wautlet, B.S., Morrissey, D., Mulheron, J., Sedman, S.A., Brinkley, P., Price, S., and Webster, K.R. (1997). Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. *J Biol Chem* 272, 18869-18874.

- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat Rev Cancer* 10, 51-57.
- Corbeel, L., and Freson, K. (2008). Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 167, 723-729.
- Courtois-Cox, S., Jones, S.L., and Cichowski, K. (2008). Many roads lead to oncogene-induced senescence. *Oncogene* 27, 2801-2809.
- 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., *et al.* (2007). Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128, 853-864.
- Curtin, J.A., Busam, K., Pinkel, D., and Bastian, B.C. (2006). Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma. *J Clin Oncol* 24, 4340-4346.
- Curtin, J.A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H.N., Busam, K.J., Kutzner, H., Cho, K.H., Aiba, S., Bröcker, E.B., LeBoit, P.E., *et al.* (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *N Engl J Med* 353, 2135-2147.
- Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., Seriolo, B., and Straub, R.H. (2001). Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 60, 729-735.
- Dai, D.L., Martinka, M., Bush, J.A., and Li, G. (2004). Reduced Apaf-1 expression in human cutaneous melanomas. *Br J Cancer* 91, 1089-1095.
- Davies, M.A., and Samuels, Y. (2010). Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene* 29, 5545-5555.
- Davis, I.J., Kim, J.J., Oszolak, F., Widlund, H.R., Rozenblatt-Rosen, O., Granter, S.R., Du, J., Fletcher, J.A., Denny, C.T., Lessnick, S.L., *et al.* (2006). Oncogenic MITF dysregulation in clear cell sarcoma: defining the MIT family of human cancers. *Cancer Cell* 9, 473-484.
- de Anta, J.M., Pérez-Castro, A.J., Freire, R., and Mayol, X. (2006). The DNA damage checkpoint is activated during residual tumour cell survival to methotrexate treatment as an initial step of acquired drug resistance. *Anticancer Drugs* 17, 1171-1177.
- de Roux, A., and Lode, H. (2003). Recent developments in antibiotic treatment. *Infect Dis Clin North Am* 17, 739-751.
- DeBerardinis, R.J., Lum, J.J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C.B. (2008). The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7, 11-20.
- Dees, E.C., Baker, S.D., O'Reilly, S., Rudek, M.A., Davidson, S.B., Aylesworth, C., Elza-Brown, K., Carducci, M.A., and Donehower, R.C. (2005). A phase I and pharmacokinetic study of short infusions of UCN-01 in patients with refractory solid tumors. *Clin Cancer Res* 11, 664-671.
- DeNardo, D.G., Andreu, P., and Coussens, L.M. (2010). Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 29, 309-316.

- Deshpande, A., Sicinski, P., and Hinds, P.W. (2005). Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene* *24*, 2909-2915.
- Desmoulin, S.K., Hou, Z., Gangjee, A., and Matherly, L.H. (2012). The human proton-coupled folate transporter: Biology and therapeutic applications to cancer. *Cancer Biol Ther* *13*, 1355-1373.
- Devoto, S.H., Mudryj, M., Pines, J., Hunter, T., and Nevins, J.R. (1992). A cyclin A-protein kinase complex possesses sequence-specific DNA binding activity: p33cdk2 is a component of the E2F-cyclin A complex. *Cell* *68*, 167-176.
- Ding, B.C., Witt, T.L., Hukku, B., Heng, H., Zhang, L., and Matherly, L.H. (2001a). Association of deletions and translocation of the reduced folate carrier gene with profound loss of gene expression in methotrexate-resistant K562 human erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol* *61*, 665-675.
- Ding, B.C., Witt, T.L., Hukku, B., Heng, H., Zhang, L., and Matherly, L.H. (2001b). Association of deletions and translocation of the reduced folate carrier gene with profound loss of gene expression in methotrexate-resistant K562 human erythroleukemia cells. *Biochem Pharmacol* *61*, 665-675.
- Dixon, K.H., Lanpher, B.C., Chiu, J., Kelley, K., and Cowan, K.H. (1994). A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem* *269*, 17-20.
- Drori, S., Sprecher, H., Shemer, G., Jansen, G., Goldman, I.D., and Assaraf, Y.G. (2000). Characterization of a human alternatively spliced truncated reduced folate carrier increasing folate accumulation in parental leukemia cells. *Eur J Biochem* *267*, 690-702.
- Du, J., Miller, A.J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., and Fisher, D.E. (2003). MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma. *Am J Pathol* *163*, 333-343.
- Du, J., Widlund, H.R., Horstmann, M.A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W.E., Nishimura, E.K., Golub, T.R., and Fisher, D.E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* *6*, 565-576.
- Dulloo, A.G., Duret, C., Rohrer, D., Girardier, L., Mensi, N., Fathi, M., Chantre, P., and Vandermander, J. (1999). Efficacy of a green tea extract rich in catechin polyphenols and caffeine in increasing 24-h energy expenditure and fat oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* *70*, 1040-1045.
- Edelman, M.J., Bauer, K.S., Wu, S., Smith, R., Bisaccia, S., and Dancey, J. (2007). Phase I and pharmacokinetic study of 7-hydroxystaurosporine and carboplatin in advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* *13*, 2667-2674.
- Erdmann, F., Lortet-Tieulent, J., Schüz, J., Zeeb, H., Greinert, R., Breitbart, E.W., and Bray, F. (2013). International trends in the incidence of malignant melanoma 1953-2008--are recent generations at higher or lower risk? *Int J Cancer* *132*, 385-400.
- Essers, J., Theil, A.F., Baldeyron, C., van Cappellen, W.A., Houtsmuller, A.B., Kanaar, R., and

- Vermeulen, W. (2005). Nuclear dynamics of PCNA in DNA replication and repair. *Mol Cell Biol* 25, 9350-9359.
- Esteller, M., Corn, P.G., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61, 3225-3229.
- Euvrard, S., Kanitakis, J., and Claudy, A. (2003). Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 348, 1681-1691.
- Evan, G.I., and d'Adda di Fagagna, F. (2009). Cellular senescence: hot or what? *Curr Opin Genet Dev* 19, 25-31.
- Facchinetti, M.M., De Siervi, A., Toskos, D., and Senderowicz, A.M. (2004). UCN-01-induced cell cycle arrest requires the transcriptional induction of p21(waf1/cip1) by activation of mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway. *Cancer Res* 64, 3629-3637.
- Falck, J., Mailand, N., Syljuåsen, R.G., Bartek, J., and Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* 410, 842-847.
- Fenech, M., Aitken, C., and Rinaldi, J. (1998). Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults. *Carcinogenesis* 19, 1163-1171.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 136, E359-386.
- Feron, O. (2009). Pyruvate into lactate and back: from the Warburg effect to symbiotic energy fuel exchange in cancer cells. *Radiother Oncol* 92, 329-333.
- Ferrara, N. (2010). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 21-26.
- Ferreri, A.J., Dell'Oro, S., Capello, D., Ponzoni, M., Iuzzolino, P., Rossi, D., Pasini, F., Ambrosetti, A., Orvieto, E., Ferrarese, F., *et al.* (2004). Aberrant methylation in the promoter region of the reduced folate carrier gene is a potential mechanism of resistance to methotrexate in primary central nervous system lymphomas. *Br J Haematol* 126, 657-664.
- Fierke, C.A., Johnson, K.A., and Benkovic, S.J. (1987). Construction and evaluation of the kinetic scheme associated with dihydrofolate reductase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26, 4085-4092.
- Figueiredo, A.C., Wasmeier, C., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Baron, R.A., and Seabra, M.C. (2008). Rab3GEP is the non-redundant guanine nucleotide exchange factor for Rab27a in melanocytes. *J Biol Chem* 283, 23209-23216.
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., *et al.* (2012). Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N Engl J Med* 367, 107-114.

- Flintoff, W.F., and Essani, K. (1980). Methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells contain a dihydrofolate reductase with an altered affinity for methotrexate. *Biochemistry* *19*, 4321-4327.
- Flores, E.R., Tsai, K.Y., Crowley, D., Sengupta, S., Yang, A., McKeon, F., and Jacks, T. (2002). p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature* *416*, 560-564.
- Flynn, R.L., and Zou, L. (2011). ATR: a master conductor of cellular responses to DNA replication stress. *Trends Biochem Sci* *36*, 133-140.
- Fresno Vara, J.A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* *30*, 193-204.
- Friedman, R.J., Rigel, D.S., and Kopf, A.W. (1985). Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J Clin* *35*, 130-151.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Imai, K., and Nakachi, K. (2002a). Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Lett* *188*, 9-13.
- Fujiki, H., Suganuma, M., Imai, K., and Nakachi, K. (2002b). Green tea: cancer preventive beverage and/or drug. *Cancer Lett* *188*, 9-13.
- Fukuda, M., and Kuroda, T.S. (2004). Missense mutations in the globular tail of myosin-Va in dilute mice partially impair binding of Slac2-a/melanophilin. *J Cell Sci* *117*, 583-591.
- Fukuda, M., Kuroda, T.S., and Mikoshiba, K. (2002). Slac2-a/melanophilin, the missing link between Rab27 and myosin Va: implications of a tripartite protein complex for melanosome transport. *J Biol Chem* *277*, 12432-12436.
- Ganapathy, V., Smith, S.B., and Prasad, P.D. (2004). SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch* *447*, 641-646.
- Garbe, C., Büttner, P., Weiss, J., Soyer, H.P., Stocker, U., Krüger, S., Roser, M., Weckbecker, J., Panizzon, R., and Bahmer, F. (1994). Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol* *102*, 695-699.
- Garbe, C., and Leiter, U. (2009). Melanoma epidemiology and trends. *Clin Dermatol* *27*, 3-9.
- García-Sevilla, F., Garrido-del Solo, C., Duggleby, R.G., García-Cánovas, F., Peyró, R., and Varón, R. (2000). Use of a windows program for simulation of the progress curves of reactants and intermediates involved in enzyme-catalyzed reactions. *Biosystems* *54*, 151-164.
- Garibyan, L., and Fisher, D.E. (2010). How sunlight causes melanoma. *Curr Oncol Rep* *12*, 319-326.
- Garraway, L.A., Widlund, H.R., Rubin, M.A., Getz, G., Berger, A.J., Ramaswamy, S., Beroukhi, R., Milner, D.A., Granter, S.R., Du, J., *et al.* (2005). Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* *436*, 117-122.
- Gatei, M., Sloper, K., Sorensen, C., Syljuäsen, R., Falck, J., Hobson, K., Savage, K., Lukas, J., Zhou, B.B., Bartek, J., *et al.* (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent

- phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem* 278, 14806-14811.
- Giehl, K. (2005). Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 386, 193-205.
- Goding, C.R. (2000). Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes Dev* 14, 1712-1728.
- Goldie, J.H., Krystal, G., Hartley, D., Gudauskas, G., and Dedhar, S. (1980). A methotrexate insensitive variant of folate reductase present in two lines of methotrexate-resistant L5178Y cells. *Eur J Cancer* 16, 1539-1546.
- Gorlick, R., Goker, E., Trippett, T., Steinherz, P., Elisseyeff, Y., Mazumdar, M., Flintoff, W.F., and Bertino, J.R. (1997). Defective transport is a common mechanism of acquired methotrexate resistance in acute lymphocytic leukemia and is associated with decreased reduced folate carrier expression. *Blood* 89, 1013-1018.
- Gouni-Berthold, I., and Sachinidis, A. (2004). Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. *Curr Pharm Des* 10, 1261-1271.
- Graham, H.N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21, 334-350.
- Graves, P.R., Yu, L., Schwarz, J.K., Gales, J., Sausville, E.A., O'Connor, P.M., and Piwnica-Worms, H. (2000). The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 275, 5600-5605.
- Grichnik, J.M. (2006). Kit and melanocyte migration. *J Invest Dermatol* 126, 945-947.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 140, 883-899.
- Grover, R., Chana, J.S., Wilson, G.D., Richman, P.I., and Sanders, R. (1998). An analysis of p16 protein expression in sporadic malignant melanoma. *Melanoma Res* 8, 267-272.
- Göker, E., Waltham, M., Kheradpour, A., Trippett, T., Mazumdar, M., Elisseyeff, Y., Schnieders, B., Steinherz, P., Tan, C., and Berman, E. (1995). Amplification of the dihydrofolate reductase gene is a mechanism of acquired resistance to methotrexate in patients with acute lymphoblastic leukemia and is correlated with p53 gene mutations. *Blood* 86, 677-684.
- Haber, D.A., Beverley, S.M., Kiely, M.L., and Schimke, R.T. (1981). Properties of an altered dihydrofolate reductase encoded by amplified genes in cultured mouse fibroblasts. *J Biol Chem* 256, 9501-9510.
- Hamilton-Miller, J.M. (2001). Anti-cariogenic properties of tea (*Camellia sinensis*). *J Med Microbiol* 50, 299-302.
- Han, C. (1997). Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer Lett* 114, 153-158.

- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
- Hansel, D.E., Meeker, A.K., Hicks, J., De Marzo, A.M., Lillemoe, K.D., Schulick, R., Hruban, R.H., Maitra, A., and Argani, P. (2006). Telomere length variation in biliary tract metaplasia, dysplasia, and carcinoma. *Mod Pathol* *19*, 772-779.
- Harland, M., Taylor, C.F., Bass, S., Churchman, M., Randerson-Moor, J.A., Holland, E.A., Mann, G.J., Bishop, D.T., and Newton Bishop, J.A. (2005). Intronic sequence variants of the CDKN2A gene in melanoma pedigrees. *Genes Chromosomes Cancer* *43*, 128-136.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J. (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* *75*, 805-816.
- Harper, J.W., Elledge, S.J., Keyomarsi, K., Dynlacht, B., Tsai, L.H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., and Swindell, E. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* *6*, 387-400.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., and Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* *387*, 296-299.
- Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Kaempgen, E., *et al.* (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* *380*, 358-365.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* *62*, 1180-1190.
- Hemesath, T.J., Price, E.R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D.E. (1998). MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* *391*, 298-301.
- Hewitt, C., Lee Wu, C., Evans, G., Howell, A., Elles, R.G., Jordan, R., Sloan, P., Read, A.P., and Thakker, N. (2002). Germline mutation of ARF in a melanoma kindred. *Hum Mol Genet* *11*, 1273-1279.
- Hingorani, S.R., Jacobetz, M.A., Robertson, G.P., Herlyn, M., and Tuveson, D.A. (2003). Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* *63*, 5198-5202.
- Hitchings, G.H., and Burchall, J.J. (1965). Inhibition of folate biosynthesis and function as a basis for chemotherapy. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* *27*, 417-468.
- Hoashi, T., Watabe, H., Muller, J., Yamaguchi, Y., Vieira, W.D., and Hearing, V.J. (2005). MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *J Biol Chem* *280*, 14006-14016.
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., *et al.* (2010). Improved survival with ipilimumab in

- patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 363, 711-723.
- Hoegge, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. (2002). RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 419, 135-141.
- Holder, W.D., White, R.L., Zuger, J.H., Easton, E.J., and Greene, F.L. (1998). Effectiveness of positron emission tomography for the detection of melanoma metastases. *Ann Surg* 227, 764-769; discussion 769-771.
- Holly, E.A., Kelly, J.W., Shpall, S.N., and Chiu, S.H. (1987). Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 17, 459-468.
- Hooijberg, J.H., Broxterman, H.J., Kool, M., Assaraf, Y.G., Peters, G.J., Noordhuis, P., Scheper, R.J., Borst, P., Pinedo, H.M., and Jansen, G. (1999). Antifolate resistance mediated by the multidrug resistance proteins MRP1 and MRP2. *Cancer Res* 59, 2532-2535.
- Horns, R.C., Dower, W.J., and Schimke, R.T. (1984). Gene amplification in a leukemic patient treated with methotrexate. *J Clin Oncol* 2, 2-7.
- Hou, Z., Cherian, C., Drews, J., Wu, J., and Matherly, L.H. (2010). Identification of the minimal functional unit of the homo-oligomeric human reduced folate carrier. *J Biol Chem* 285, 4732-4740.
- Hou, Z., Orr, S., and Matherly, L.H. (2014). Post-transcriptional regulation of the human reduced folate carrier as a novel adaptive mechanism in response to folate excess or deficiency. *Biosci Rep* 34.
- Howell, E.E., Villafranca, J.E., Warren, M.S., Oatley, S.J., and Kraut, J. (1986). Functional role of aspartic acid-27 in dihydrofolate reductase revealed by mutagenesis. *Science* 231, 1123-1128.
- Huang, Z. (2000). Bcl-2 family proteins as targets for anticancer drug design. *Oncogene* 19, 6627-6631.
- Hugo, H., Ackland, M.L., Blick, T., Lawrence, M.G., Clements, J.A., Williams, E.D., and Thompson, E.W. (2007). Epithelial--mesenchymal and mesenchymal--epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol* 213, 374-383.
- Hume, A.N., Tarafder, A.K., Ramalho, J.S., Sviderskaya, E.V., and Seabra, M.C. (2006). A coiled-coil domain of melanophilin is essential for Myosin Va recruitment and melanosome transport in melanocytes. *Mol Biol Cell* 17, 4720-4735.
- Hurley, P.J., and Bunz, F. (2007). ATM and ATR: components of an integrated circuit. *Cell Cycle* 6, 414-417.
- Ibrahim, N., and Haluska, F.G. (2009). Molecular pathogenesis of cutaneous melanocytic neoplasms. *Annu Rev Pathol* 4, 551-579.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., *et al.* (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* 407, 645-648.

- Jackman, A.L., Kimbell, R., Aherne, G.W., Brunton, L., Jansen, G., Stephens, T.C., Smith, M.N., Wardleworth, J.M., and Boyle, F.T. (1997). Cellular pharmacology and in vivo activity of a new anticancer agent, ZD9331: a water-soluble, nonpolyglutamatable, quinazoline-based inhibitor of thymidylate synthase. *Clin Cancer Res* 3, 911-921.
- Jackson, R.C., Fry, D.W., Boritzki, T.J., Besserer, J.A., Leopold, W.R., Sloan, B.J., and Elslager, E.F. (1984). Biochemical pharmacology of the lipophilic antifolate, trimetrexate. *Adv Enzyme Regul* 22, 187-206.
- Jackson, R.C., Hart, L.I., and Harrap, K.R. (1976). Intrinsic resistance to methotrexate of cultured mammalian cells in relation to the inhibition kinetics of their dihydrofolate reductases. *Cancer Res* 36, 1991-1997.
- Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071-1078.
- Jacobs, S.A., Stoller, R.G., Chabner, B.A., and Johns, D.G. (1976). 7-Hydroxymethotrexate as a urinary metabolite in human subjects and rhesus monkeys receiving high dose methotrexate. *J Clin Invest* 57, 534-538.
- Jansen, B., Schlagbauer-Wadl, H., Brown, B.D., Bryan, R.N., van Elsas, A., Müller, M., Wolff, K., Eichler, H.G., and Pehamberger, H. (1998). bcl-2 antisense therapy chemosensitizes human melanoma in SCID mice. *Nat Med* 4, 232-234.
- Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., and Thun, M. (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52, 23-47.
- Jiang, B.H., and Liu, L.Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res* 102, 19-65.
- Jimeno, A., Rudek, M.A., Purcell, T., Laheru, D.A., Messersmith, W.A., Dancey, J., Carducci, M.A., Baker, S.D., Hidalgo, M., and Donehower, R.C. (2008). Phase I and pharmacokinetic study of UCN-01 in combination with irinotecan in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 61, 423-433.
- Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128, 683-692.
- Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev* 23, 537-548.
- Kaghad, M., Bonnet, H., Yang, A., Creancier, L., Biscan, J.C., Valent, A., Minty, A., Chalon, P., Lelias, J.M., Dumont, X., *et al.* (1997). Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90, 809-819.
- Kamen, B.A., and Smith, A.K. (2004). A review of folate receptor alpha cycling and 5-methyltetrahydrofolate accumulation with an emphasis on cell models in vitro. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1085-1097.
- Kamijo, T., Weber, J.D., Zambetti, G., Zindy, F., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1998). Functional and

- physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 8292-8297.
- Kannan, K., Kaminski, N., Rechavi, G., Jakob-Hirsch, J., Amariglio, N., and Givol, D. (2001). DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene* *20*, 3449-3455.
- Karnoub, A.E., and Weinberg, R.A. (2006). Chemokine networks and breast cancer metastasis. *Breast Dis* *26*, 75-85.
- Kastan, M.B. (2008). DNA damage responses: mechanisms and roles in human disease: 2007 G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture. *Mol Cancer Res* *6*, 517-524.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316-323.
- Kastan, M.B., Lim, D.S., Kim, S.T., Xu, B., and Canman, C. (2000). Multiple signaling pathways involving ATM. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *65*, 521-526.
- Kaufman, Y., Ifergan, I., Rothem, L., Jansen, G., and Assaraf, Y.G. (2006). Coexistence of multiple mechanisms of PT523 resistance in human leukemia cells harboring 3 reduced folate carrier alleles: transcriptional silencing, inactivating mutations, and allele loss. *Blood* *107*, 3288-3294.
- Kawai, K., Tsuno, N.H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Hori, N., Watanabe, T., Takahashi, K., and Nagawa, H. (2003). Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *J Allergy Clin Immunol* *112*, 951-957.
- Kawai, T., Hiroi, S., Nakanishi, K., and Meeker, A.K. (2007). Telomere length and telomerase expression in atypical adenomatous hyperplasia and small bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *Am J Clin Pathol* *127*, 254-262.
- Kawakami, K., Futami, H., Takahara, J., and Yamaguchi, K. (1996). UCN-01, 7-hydroxyl-staurosporine, inhibits kinase activity of cyclin-dependent kinases and reduces the phosphorylation of the retinoblastoma susceptibility gene product in A549 human lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* *219*, 778-783.
- Kazerounian, S., Yee, K.O., and Lawler, J. (2008). Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* *65*, 700-712.
- Kelemen, L.E. (2006). The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? *Int J Cancer* *119*, 243-250.
- Kennedy, K.M., and Dewhirst, M.W. (2010). Tumor metabolism of lactate: the influence and therapeutic potential for MCT and CD147 regulation. *Future Oncol* *6*, 127-148.
- Kessenbrock, K., Plaks, V., and Werb, Z. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* *141*, 52-67.
- Khan, N., and Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. *Life Sci* *81*, 519-533.
- Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to

- immune escape. *Immunology* 121, 1-14.
- Koff, A., Cross, F., Fisher, A., Schumacher, J., Leguellec, K., Philippe, M., and Roberts, J.M. (1991). Human cyclin E, a new cyclin that interacts with two members of the CDC2 gene family. *Cell* 66, 1217-1228.
- Koh, J., Enders, G.H., Dynlacht, B.D., and Harlow, E. (1995). Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. *Nature* 375, 506-510.
- Kortmansky, J., Shah, M.A., Kaubisch, A., Weyerbacher, A., Yi, S., Tong, W., Sowers, R., Gonen, M., O'reilly, E., Kemeny, N., *et al.* (2005). Phase I trial of the cyclin-dependent kinase inhibitor and protein kinase C inhibitor 7-hydroxystaurosporine in combination with Fluorouracil in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 23, 1875-1884.
- Koyanagi, K., O'Day, S.J., Gonzalez, R., Lewis, K., Robinson, W.A., Amatruda, T.T., Kuo, C., Wang, H.J., Milford, R., Morton, D.L., *et al.* (2006). Microphthalmia transcription factor as a molecular marker for circulating tumor cell detection in blood of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 12, 1137-1143.
- Kranenburg, O., Gebbink, M.F., and Voest, E.E. (2004). Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta* 1654, 23-37.
- Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell* 13, 472-482.
- Kufe, D.W., Wick, M.M., and Abelson, H.T. (1980). Natural resistance to methotrexate in human melanomas. *J Invest Dermatol* 75, 357-359.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H.Y., and Dunphy, W.G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell* 124, 943-955.
- Kumar, R., Angelini, S., and Hemminki, K. (2003). Activating BRAF and N-Ras mutations in sporadic primary melanomas: an inverse association with allelic loss on chromosome 9. *Oncogene* 22, 9217-9224.
- Kummar, S., Gutierrez, M.E., Gardner, E.R., Figg, W.D., Melillo, G., Dancey, J., Sausville, E.A., Conley, B.A., Murgo, A.J., and Doroshow, J.H. (2010). A phase I trial of UCN-01 and prednisone in patients with refractory solid tumors and lymphomas. *Cancer Chemother Pharmacol* 65, 383-389.
- Kuo, L.J., and Yang, L.X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo* 22, 305-309.
- Kuphal, S., and Bosserhoff, A. (2009). Recent progress in understanding the pathology of malignant melanoma. *J Pathol* 219, 400-409.
- Kushimoto, T., Basrur, V., Valencia, J., Matsunaga, J., Vieira, W.D., Ferrans, V.J., Muller, J., Appella, E., and Hearing, V.J. (2001). A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10698-10703.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of

- bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lambert, J., Naeyaert, J.M., Callens, T., De Paepe, A., and Messiaen, L. (1998). Human myosin V gene produces different transcripts in a cell type-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* 252, 329-333.
- Lambert, J., Naeyaert, J.M., De Paepe, A., Van Coster, R., Ferster, A., Song, M., and Messiaen, L. (2000). arg-cys substitution at codon 1246 of the human myosin Va gene is not associated with Griscelli syndrome. *J Invest Dermatol* 114, 731-733.
- Langford, G.M. (2002). Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3, 859-865.
- Lara, P.N., Mack, P.C., Synold, T., Frankel, P., Longmate, J., Gumerlock, P.H., Doroshow, J.H., and Gandara, D.R. (2005). The cyclin-dependent kinase inhibitor UCN-01 plus cisplatin in advanced solid tumors: a California cancer consortium phase I pharmacokinetic and molecular correlative trial. *Clin Cancer Res* 11, 4444-4450.
- Leamon, C.P., and Low, P.S. (1991). Delivery of macromolecules into living cells: a method that exploits folate receptor endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5572-5576.
- Lee, J., Kumagai, A., and Dunphy, W.G. (2007). The Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates interaction of TopBP1 with ATR. *J Biol Chem* 282, 28036-28044.
- Lee, J.H., and Paull, T.T. (2007). Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. *Oncogene* 26, 7741-7748.
- Lee, S., and Margolin, K. (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma. *Curr Oncol Rep* 14, 468-474.
- Lekmine, F., Chang, C.K., Sethakorn, N., Das Gupta, T.K., and Salti, G.I. (2007). Role of microphthalmia transcription factor (Mitf) in melanoma differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 354, 830-835.
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Luccioni, C., Beaumatin, J., Clair, M., Kornowski, A., Dussaulx, E., Dutrillaux, B., and Zweibaum, A. (1991). Dihydrofolate reductase gene amplification-associated shift of differentiation in methotrexate-adapted HT-29 cells. *J Cell Biol* 115, 1409-1418.
- Levy, C., Khaled, M., and Fisher, D.E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med* 12, 406-414.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Li, T., Christensen, S.D., Frankel, P.H., Margolin, K.A., Agarwala, S.S., Luu, T., Mack, P.C., Lara, P.N., and Gandara, D.R. (2012). A phase II study of cell cycle inhibitor UCN-01 in patients with metastatic melanoma: a California Cancer Consortium trial. *Invest New Drugs* 30, 741-748.
- Liang, Y., Lin, S.Y., Brunicardi, F.C., Goss, J., and Li, K. (2009). DNA damage response pathways in

- tumor suppression and cancer treatment. *World J Surg* 33, 661-666.
- Lickliter, J.D., Cox, J., McCarron, J., Martinez, N.R., Schmidt, C.W., Lin, H., Nieda, M., and Nicol, A.J. (2007). Small-molecule Bcl-2 inhibitors sensitise tumour cells to immune-mediated destruction. *Br J Cancer* 96, 600-608.
- Liu, M., Whetstine, J.R., Payton, S.G., Ge, Y., Flatley, R.M., and Matherly, L.H. (2004). Roles of USF, Ikaros and Sp proteins in the transcriptional regulation of the human reduced folate carrier B promoter. *Biochem J* 383, 249-257.
- Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* 26, 6056-6064.
- Lo, J.A., and Fisher, D.E. (2014). The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. *Science* 346, 945-949.
- Loercher, A.E., Tank, E.M., Delston, R.B., and Harbour, J.W. (2005). MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol* 168, 35-40.
- Lomonosov, M., Anand, S., Sangrithi, M., Davies, R., and Venkitaraman, A.R. (2003). Stabilization of stalled DNA replication forks by the BRCA2 breast cancer susceptibility protein. *Genes Dev* 17, 3017-3022.
- Lowe, S.W., Cepero, E., and Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432, 307-315.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol* 5, 255-260.
- Ma, D., Huang, H., and Moscow, J.A. (2000). Down-regulation of reduced folate carrier gene (RFC1) expression after exposure to methotrexate in ZR-75-1 breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 279, 891-897.
- Mabe, K., Yamada, M., Oguni, I., and Takahashi, T. (1999). In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 1788-1791.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2008). Systems biology of vascular endothelial growth factors. *Microcirculation* 15, 715-738.
- Majumdar, S., and Aggarwal, B.B. (2001). Methotrexate suppresses NF-kappaB activation through inhibition of IkappaBalpha phosphorylation and degradation. *J Immunol* 167, 2911-2920.
- Mandel, S., and Youdim, M.B. (2004). Catechin polyphenols: neurodegeneration and neuroprotection in neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* 37, 304-317.
- Marini, A., Mirmohammadsadegh, A., Nambiar, S., Gustrau, A., Ruzicka, T., and Hengge, U.R. (2006). Epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in serum of patients with cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol* 126, 422-431.
- Markovic, S.N., Erickson, L.A., Rao, R.D., Weenig, R.H., Pockaj, B.A., Bardia, A., Vachon, C.M., Schild,

- S.E., McWilliams, R.R., Hand, J.L., *et al.* (2007). Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc* 82, 364-380.
- Marks, M.S., and Seabra, M.C. (2001). The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 738-748.
- Marti, G.E., Stetler-Stevenson, M., Grant, N.D., White, T., Figg, W.D., Tohnya, T., Jaffe, E.S., Dunleavy, K., Janik, J.E., Steinberg, S.M., *et al.* (2011). Phase I trial of 7-hydroxystaurosporine and fludarabine phosphate: in vivo evidence of 7-hydroxystaurosporine induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 52, 2284-2292.
- Matherly, L.H., and Goldman, D.I. (2003). Membrane transport of folates. *Vitam Horm* 66, 403-456.
- Matherly, L.H., Wilson, M.R., and Hou, Z. (2014). The major facilitative folate transporters solute carrier 19A1 and solute carrier 46A1: biology and role in antifolate chemotherapy of cancer. *Drug Metab Dispos* 42, 632-649.
- Matsushime, H., Ewen, M.E., Strom, D.K., Kato, J.Y., Hanks, S.K., Roussel, M.F., and Sherr, C.J. (1992). Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell* 71, 323-334.
- McArthur, G.A., Chapman, P.B., Robert, C., Larkin, J., Haanen, J.B., Dummer, R., Ribas, A., Hogg, D., Hamid, O., Ascierto, P.A., *et al.* (2014). Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *Lancet Oncol* 15, 323-332.
- 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., *et al.* (2002). Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell* 109, 707-718.
- McGuire, J.J. (2003). Anticancer antifolates: current status and future directions. *Curr Pharm Des* 9, 2593-2613.
- Meier, F., Schitteck, B., Busch, S., Garbe, C., Smalley, K., Satyamoorthy, K., Li, G., and Herlyn, M. (2005). The RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways present molecular targets for the effective treatment of advanced melanoma. *Front Biosci* 10, 2986-3001.
- Melera, P.W., Davide, J.P., Hession, C.A., and Scotto, K.W. (1984). Phenotypic expression in *Escherichia coli* and nucleotide sequence of two Chinese hamster lung cell cDNAs encoding different dihydrofolate reductases. *Mol Cell Biol* 4, 38-48.
- Melino, G., Bernassola, F., Ranalli, M., Yee, K., Zong, W.X., Corazzari, M., Knight, R.A., Green, D.R., Thompson, C., and Vousden, K.H. (2004). p73 Induces apoptosis via PUMA transactivation and Bax mitochondrial translocation. *J Biol Chem* 279, 8076-8083.
- Melnikova, V., and Bar-Eli, M. (2007). Inflammation and melanoma growth and metastasis: the role of platelet-activating factor (PAF) and its receptor. *Cancer Metastasis Rev* 26, 359-371.
- Menasche, G., Feldmann, J., Houdusse, A., Desaynard, C., Fischer, A., Goud, B., and de Saint Basile, G. (2003). Biochemical and functional characterization of Rab27a mutations occurring in Griscelli

- syndrome patients. *Blood* *101*, 2736-2742.
- Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* *14*, 2077-2086.
- Micalizzi, D.S., Farabaugh, S.M., and Ford, H.L. (2010). Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *15*, 117-134.
- Michaloglou, C., Vredeveld, L.C., Soengas, M.S., Denoyelle, C., Kuilman, T., van der Horst, C.M., Majoor, D.M., Shay, J.W., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* *436*, 720-724.
- Middleton, M.R., Grob, J.J., Aaronson, N., Fierlbeck, G., Tilgen, W., Seiter, S., Gore, M., Aamdal, S., Cebon, J., Coates, A., *et al.* (2000). Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol* *18*, 158-166.
- Mirmohammadsadegh, A., Marini, A., Nambiar, S., Hassan, M., Tannapfel, A., Ruzicka, T., and Hengge, U.R. (2006). Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma. *Cancer Res* *66*, 6546-6552.
- 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., *et al.* (2012). An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature* *491*, 449-453.
- Miyachi, H., Takemura, Y., Kobayashi, H., and Ando, Y. (1995). Expression of variant dihydrofolate reductase with decreased binding affinity to antifolates in MOLT-3 human leukemia cell lines resistant to trimetrexate. *Cancer Lett* *88*, 93-99.
- Mizuno, K., Noda, K., Ueda, Y., Hanaki, H., Saido, T.C., Ikuta, T., Kuroki, T., Tamaoki, T., Hirai, S., and Osada, S. (1995). UCN-01, an anti-tumor drug, is a selective inhibitor of the conventional PKC subfamily. *FEBS Lett* *359*, 259-261.
- Molinari, M., Mercurio, C., Dominguez, J., Goubin, F., and Draetta, G.F. (2000). Human Cdc25 A inactivation in response to S phase inhibition and its role in preventing premature mitosis. *EMBO Rep* *1*, 71-79.
- Moll, U.M., and Slade, N. (2004). p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* *2*, 371-386.
- Morgan, S.L., Baggott, J.E., Lee, J.Y., and Alarcón, G.S. (1998). Folic acid supplementation prevents deficient blood folate levels and hyperhomocysteinemia during longterm, low dose methotrexate therapy for rheumatoid arthritis: implications for cardiovascular disease prevention. *J Rheumatol* *25*, 441-446.
- Morton, D.L., Thompson, J.F., Cochran, A.J., Mozzillo, N., Elashoff, R., Essner, R., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Hoekstra, H.J., Karakousis, C.P., *et al.* (2006). Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N Engl J Med* *355*, 1307-1317.

- Moscow, J.A., Connolly, T., Myers, T.G., Cheng, C.C., Paull, K., and Cowan, K.H. (1997). Reduced folate carrier gene (RFC1) expression and anti-folate resistance in transfected and non-selected cell lines. *Int J Cancer* *72*, 184-190.
- Moscow, J.A., Gong, M., He, R., Sgagias, M.K., Dixon, K.H., Anzick, S.L., Meltzer, P.S., and Cowan, K.H. (1995). Isolation of a gene encoding a human reduced folate carrier (RFC1) and analysis of its expression in transport-deficient, methotrexate-resistant human breast cancer cells. *Cancer Res* *55*, 3790-3794.
- Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Adv Cancer Res* *107*, 57-117.
- Mukhtar, H., and Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* *71*, 1698S-1702S; discussion 1703S-1694S.
- Nagashima, K., Torii, S., Yi, Z., Igarashi, M., Okamoto, K., Takeuchi, T., and Izumi, T. (2002). Melanophilin directly links Rab27a and myosin Va through its distinct coiled-coil regions. *FEBS Lett* *517*, 233-238.
- Nagy, J.A., Chang, S.H., Shih, S.C., Dvorak, A.M., and Dvorak, H.F. (2010). Heterogeneity of the tumor vasculature. *Semin Thromb Hemost* *36*, 321-331.
- Nakagawa, K., and Miyazawa, T. (1997). Chemiluminescence-high-performance liquid chromatographic determination of tea catechin, (-)-epigallocatechin 3-gallate, at picomole levels in rat and human plasma. *Anal Biochem* *248*, 41-49.
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., García-Cánovas, F., Durrant, M.C., Thorneley, R.N., and Rodríguez-López, J.N. (2005a). The antifolate activity of tea catechins. *Cancer Res* *65*, 2059-2064.
- Navarro-Perán, E., Cabezas-Herrera, J., Hiner, A.N., Sadunishvili, T., García-Cánovas, F., and 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*, 7512-7525.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 220-228.
- Nelson, B.H. (2008). The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* *222*, 101-116.
- O., W. (1931). *The metabolism of tumours. Investigations from the Kaiser-Wilhelm Institute for Biology, Berlin-Dahlem.* (London, UK).
- Ofir-Rosenfeld, Y., Boggs, K., Michael, D., Kastan, M.B., and Oren, M. (2008). Mdm2 regulates p53 mRNA translation through inhibitory interactions with ribosomal protein L26. *Mol Cell* *32*, 180-189.
- Okada, T., Lopez-Lago, M., and Giancotti, F.G. (2005). Merlin/NF-2 mediates contact inhibition of growth by suppressing recruitment of Rac to the plasma membrane. *J Cell Biol* *171*, 361-371.
- Okuyama, S., Gonzalez, R., and Lewis, K.D. (2010). Pegylated interferon alpha-2b as adjuvant

- treatment of Stage III malignant melanoma: an evidence-based review. *Core Evid* 5, 39-48.
- Omholt, K., Kröckel, D., Ringborg, U., and Hansson, J. (2006). Mutations of PIK3CA are rare in cutaneous melanoma. *Melanoma Res* 16, 197-200.
- Orlow, S.J. (1995). Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 105, 3-7.
- OSBORN, M.J., FREEMAN, M., and HUENNEKENS, F.M. (1958). Inhibition of dihydrofolic reductase by aminopterin and amethopterin. *Proc Soc Exp Biol Med* 97, 429-431.
- OSBORN, M.J., and HUENNEKENS, F.M. (1958). Enzymatic reduction of dihydrofolic acid. *J Biol Chem* 233, 969-974.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 182, 4499-4506.
- Oxenberg, J., and Kane, J.M. (2014). The role of radiation therapy in melanoma. *Surg Clin North Am* 94, 1031-1047, viii.
- Pagès, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautès-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29, 1093-1102.
- Parker, N., Turk, M.J., Westrick, E., Lewis, J.D., Low, P.S., and Leamon, C.P. (2005). Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. *Anal Biochem* 338, 284-293.
- Pastural, E., Barrat, F.J., Dufourcq-Lagelouse, R., Certain, S., Sanal, O., Jabado, N., Seger, R., Griscelli, C., Fischer, A., and de Saint Basile, G. (1997). Griscelli disease maps to chromosome 15q21 and is associated with mutations in the myosin-Va gene. *Nat Genet* 16, 289-292.
- Patel, V., Lahusen, T., Leethanakul, C., Igishi, T., Kremer, M., Quintanilla-Martinez, L., Ensley, J.F., Sausville, E.A., Gutkind, J.S., and Senderowicz, A.M. (2002). Antitumor activity of UCN-01 in carcinomas of the head and neck is associated with altered expression of cyclin D3 and p27(KIP1). *Clin Cancer Res* 8, 3549-3560.
- Payton, S.G., Whetstine, J.R., Ge, Y., and Matherly, L.H. (2005). Transcriptional regulation of the human reduced folate carrier promoter C: synergistic transactivation by Sp1 and C/EBP beta and identification of a downstream repressor. *Biochim Biophys Acta* 1727, 45-57.
- Peinado, H., Lavotshkin, S., and Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Semin Cancer Biol* 21, 139-146.
- Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J Cell Sci* 117, 2827-2839.
- Pfeffer, U., Ferrari, N., Morini, M., Benelli, R., Noonan, D.M., and Albini, A. (2003). Antiangiogenic activity of chemopreventive drugs. *Int J Biol Markers* 18, 70-74.

- Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., *et al.* (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8372-8377.
- Pinner, S., Jordan, P., Sharrock, K., Bazley, L., Collinson, L., Marais, R., Bonvin, E., Goding, C., and Sahai, E. (2009). Intravital imaging reveals transient changes in pigment production and Brn2 expression during metastatic melanoma dissemination. *Cancer Res* *69*, 7969-7977.
- Pogenberg, V., Ogmundsdóttir, M.H., Bergsteinsdóttir, K., Schepsky, A., Phung, B., Deineko, V., Milewski, M., Steingrímsson, E., and Wilmanns, M. (2012). Restricted leucine zipper dimerization and specificity of DNA recognition of the melanocyte master regulator MITF. *Genes Dev* *26*, 2647-2658.
- Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* *9*, 738-748.
- 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., *et al.* (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* *33*, 19-20.
- Prichard, M.N., Prichard, L.E., and Shipman, C. (1993). Inhibitors of thymidylate synthase and dihydrofolate reductase potentiate the antiviral effect of acyclovir. *Antiviral Res* *20*, 249-259.
- Puig-Kröger, A., Sierra-Filardi, E., Domínguez-Soto, A., Samaniego, R., Corcuera, M.T., Gómez-Aguado, F., Ratnam, M., Sánchez-Mateos, P., and Corbí, A.L. (2009). Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer Res* *69*, 9395-9403.
- Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* *141*, 39-51.
- Qiu, A., Jansen, M., Sakaris, A., Min, S.H., Chattopadhyay, S., Tsai, E., Sandoval, C., Zhao, R., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2006). Identification of an intestinal folate transporter and the molecular basis for hereditary folate malabsorption. *Cell* *127*, 917-928.
- Raica, M., Cimpean, A.M., and Ribatti, D. (2009). Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur J Cancer* *45*, 1924-1934.
- Raimondi, S., Sera, F., Gandini, S., Iodice, S., Caini, S., Maisonneuve, P., and Fargnoli, M.C. (2008). MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* *122*, 2753-2760.
- Ramadan, S., Terrinoni, A., Catani, M.V., Sayan, A.E., Knight, R.A., Mueller, M., Krammer, P.H., Melino, G., and Candi, E. (2005). p73 induces apoptosis by different mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun* *331*, 713-717.
- Raposo, G., and Marks, M.S. (2007). Melanosomes--dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* *8*, 786-797.

- Raposo, G., Tenza, D., Murphy, D.M., Berson, J.F., and Marks, M.S. (2001). Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *J Cell Biol* 152, 809-824.
- Rask, C., Albertioni, F., Bentzen, S.M., Schroeder, H., and Peterson, C. (1998). Clinical and pharmacokinetic risk factors for high-dose methotrexate-induced toxicity in children with acute lymphoblastic leukemia--a logistic regression analysis. *Acta Oncol* 37, 277-284.
- Ravanat, J.L., Douki, T., and Cadet, J. (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B* 63, 88-102.
- Raynaud, C.M., Hernandez, J., Llorca, F.P., Nuciforo, P., Mathieu, M.C., Commo, F., Delalogue, S., Sabatier, L., André, F., and Soria, J.C. (2010). DNA damage repair and telomere length in normal breast, preneoplastic lesions, and invasive cancer. *Am J Clin Oncol* 33, 341-345.
- Rees, J.L. (2003). Genetics of hair and skin color. *Annu Rev Genet* 37, 67-90.
- Reifenberger, J., Wolter, M., Boström, J., Büschges, R., Schulte, K.W., Megahed, M., Ruzicka, T., and Reifenberger, G. (2000). Allelic losses on chromosome arm 10q and mutation of the PTEN (MMAC1) tumour suppressor gene in primary and metastatic malignant melanomas. *Virchows Arch* 436, 487-493.
- Rigel, D.S., Russak, J., and Friedman, R. (2010). The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs. *CA Cancer J Clin* 60, 301-316.
- Rijnboutt, S., Jansen, G., Posthuma, G., Hynes, J.B., Schornagel, J.H., and Strous, G.J. (1996). Endocytosis of GPI-linked membrane folate receptor-alpha. *J Cell Biol* 132, 35-47.
- Robert, C., Ribas, A., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., Hamid, O., Kefford, R., Weber, J.S., Joshua, A.M., Hwu, W.J., Gangadhar, T.C., *et al.* (2014). Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet* 384, 1109-1117.
- Rod, T.H., and Brooks, C.L. (2003). How dihydrofolate reductase facilitates protonation of dihydrofolate. *J Am Chem Soc* 125, 8718-8719.
- Rodriguez, R., and Meuth, M. (2006). Chk1 and p21 cooperate to prevent apoptosis during DNA replication fork stress. *Mol Biol Cell* 17, 402-412.
- Rooseboom, M., Commandeur, J.N., and Vermeulen, N.P. (2004). Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 56, 53-102.
- Ross, J.F., Wang, H., Behm, F.G., Mathew, P., Wu, M., Booth, R., and Ratnam, M. (1999). Folate receptor type beta is a neutrophilic lineage marker and is differentially expressed in myeloid leukemia. *Cancer* 85, 348-357.
- Rothberg, K.G., Ying, Y.S., Kolhouse, J.F., Kamen, B.A., and Anderson, R.G. (1990). The glycopospholipid-linked folate receptor internalizes folate without entering the clathrin-coated pit endocytic pathway. *J Cell Biol* 110, 637-649.

- Rothem, L., Ifergan, I., Kaufman, Y., Priest, D.G., Jansen, G., and Assaraf, Y.G. (2002). Resistance to multiple novel antifolates is mediated via defective drug transport resulting from clustered mutations in the reduced folate carrier gene in human leukaemia cell lines. *Biochem J* 367, 741-750.
- Rothem, L., Stark, M., Kaufman, Y., Mayo, L., and Assaraf, Y.G. (2004). Reduced folate carrier gene silencing in multiple antifolate-resistant tumor cell lines is due to a simultaneous loss of function of multiple transcription factors but not promoter methylation. *J Biol Chem* 279, 374-384.
- Rots, M.G., Willey, J.C., Jansen, G., Van Zantwijk, C.H., Noordhuis, P., DeMuth, J.P., Kuiper, E., Veerman, A.J., Pieters, R., and Peters, G.J. (2000). mRNA expression levels of methotrexate resistance-related proteins in childhood leukemia as determined by a standardized competitive template-based RT-PCR method. *Leukemia* 14, 2166-2175.
- Roy, K., Egan, M.G., Sirlin, S., and Sirotnak, F.M. (1997). Posttranscriptionally mediated decreases in folylpolyglutamate synthetase gene expression in some folate analogue-resistant variants of the L1210 cell. Evidence for an altered cognate mRNA in the variants affecting the rate of de novo synthesis of the enzyme. *J Biol Chem* 272, 6903-6908.
- Sabharanjak, S., and Mayor, S. (2004). Folate receptor endocytosis and trafficking. *Adv Drug Deliv Rev* 56, 1099-1109.
- Salti, G.I., Manougian, T., Farolan, M., Shilkaitis, A., Majumdar, D., and Das Gupta, T.K. (2000). Microphthalmia transcription factor: a new prognostic marker in intermediate-thickness cutaneous malignant melanoma. *Cancer Res* 60, 5012-5016.
- Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T. (2002). Interference with PDK1-Akt survival signaling pathway by UCN-01 (7-hydroxystaurosporine). *Oncogene* 21, 1727-1738.
- Sawaya, M.R., and Kraut, J. (1997). Loop and subdomain movements in the mechanism of *Escherichia coli* dihydrofolate reductase: crystallographic evidence. *Biochemistry* 36, 586-603.
- Schaffer, J.V., and Bolognia, J.L. (2001). The melanocortin-1 receptor: red hair and beyond. *Arch Dermatol* 137, 1477-1485.
- Schirch, V., and Strong, W.B. (1989). Interaction of folylpolyglutamates with enzymes in one-carbon metabolism. *Arch Biochem Biophys* 269, 371-380.
- Schlacher, K., Christ, N., Siaud, N., Egashira, A., Wu, H., and Jasin, M. (2011). Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. *Cell* 145, 529-542.
- Schmalhofer, O., Brabletz, S., and Brabletz, T. (2009). E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 28, 151-166.
- Schnell, J.R., Dyson, H.J., and Wright, P.E. (2004). Structure, dynamics, and catalytic function of dihydrofolate reductase. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33, 119-140.
- Schweitzer, B.I., Dicker, A.P., and Bertino, J.R. (1990). Dihydrofolate reductase as a therapeutic target. *FASEB J* 4, 2441-2452.

- Scott, J.M. (1999). Folate and vitamin B12. *Proc Nutr Soc* 58, 441-448.
- Seabra, M.C., Mules, E.H., and Hume, A.N. (2002). Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 8, 23-30.
- Semenza, G.L. (2008). Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate. *J Clin Invest* 118, 3835-3837.
- Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr Opin Genet Dev* 20, 51-56.
- Serrone, L., Zeuli, M., Sega, F.M., and Cognetti, F. (2000). Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. *J Exp Clin Cancer Res* 19, 21-34.
- Seynaeve, C.M., Stetler-Stevenson, M., Sebers, S., Kaur, G., Sausville, E.A., and Worland, P.J. (1993). Cell cycle arrest and growth inhibition by the protein kinase antagonist UCN-01 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 53, 2081-2086.
- Shaw, G.M., Schaffer, D., Velie, E.M., Morland, K., and Harris, J.A. (1995). Periconceptual vitamin use, dietary folate, and the occurrence of neural tube defects. *Epidemiology* 6, 219-226.
- Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103-112.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68, 850-858.
- Shields, J.D., Kourtis, I.C., Tomei, A.A., Roberts, J.M., and Swartz, M.A. (2010). Induction of lymphoidlike stroma and immune escape by tumors that express the chemokine CCL21. *Science* 328, 749-752.
- Sigal, A., and Rotter, V. (2000). Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res* 60, 6788-6793.
- Simonsen, C.C., and Levinson, A.D. (1983). Isolation and expression of an altered mouse dihydrofolate reductase cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 2495-2499.
- Singer, M.J., Mesner, L.D., Friedman, C.L., Trask, B.J., and Hamlin, J.L. (2000). Amplification of the human dihydrofolate reductase gene via double minutes is initiated by chromosome breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7921-7926.
- Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Smith, J., Tho, L.M., Xu, N., and Gillespie, D.A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv Cancer Res* 108, 73-112.
- Smith, K.J., Skelton, H.G., Yeager, J., Angritt, P., and Wagner, K.F. (1993). Cutaneous neoplasms in a military population of HIV-1-positive patients. Military Medical Consortium for the Advancement of Retroviral Research. *J Am Acad Dermatol* 29, 400-406.

- Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90, 1-50.
- Soengas, M.S., Alarcón, R.M., Yoshida, H., Giaccia, A.J., Hakem, R., Mak, T.W., and Lowe, S.W. (1999). Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284, 156-159.
- Soengas, M.S., Capodiecici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J.G., Gerald, W.L., Lazebnik, Y.A., *et al.* (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409, 207-211.
- Soengas, M.S., and Lowe, S.W. (2003). Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138-3151.
- Soufir, N., Ollivaud, L., Bertrand, G., Lacapère, J.J., Descamps, V., Vitoux, D., Lebbe, C., Wolkenstein, P., Dupin, N., Saiag, P., *et al.* (2007). A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation. *J Dermatol Sci* 46, 61-64.
- Soussi, T., and Wiman, K.G. (2007). Shaping genetic alterations in human cancer: the p53 mutation paradigm. *Cancer Cell* 12, 303-312.
- Spinella, M.J., Brigle, K.E., Sierra, E.E., and Goldman, I.D. (1995). Distinguishing between folate receptor-alpha-mediated transport and reduced folate carrier-mediated transport in L1210 leukemia cells. *J Biol Chem* 270, 7842-7849.
- Srimatkandada, S., Schweitzer, B.I., Moroson, B.A., Dube, S., and Bertino, J.R. (1989). Amplification of a polymorphic dihydrofolate reductase gene expressing an enzyme with decreased binding to methotrexate in a human colon carcinoma cell line, HCT-8R4, resistant to this drug. *J Biol Chem* 264, 3524-3528.
- Stahl, J.M., Cheung, M., Sharma, A., Trivedi, N.R., Shanmugam, S., and Robertson, G.P. (2003). Loss of PTEN promotes tumor development in malignant melanoma. *Cancer Res* 63, 2881-2890.
- Stahl, J.M., Sharma, A., Cheung, M., Zimmerman, M., Cheng, J.Q., Bosenberg, M.W., Kester, M., Sandirasegarane, L., and Robertson, G.P. (2004). Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer Res* 64, 7002-7010.
- Stapleton, P.D., Shah, S., Anderson, J.C., Hara, Y., Hamilton-Miller, J.M., and Taylor, P.W. (2004). Modulation of beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus* by catechins and gallates. *Int J Antimicrob Agents* 23, 462-467.
- Stark, M., and Assaraf, Y.G. (2006). Loss of Sp1 function via inhibitory phosphorylation in antifolate-resistant human leukemia cells with down-regulation of the reduced folate carrier. *Blood* 107, 708-715.
- Steingrímsson, E., Copeland, N.G., and Jenkins, N.A. (2004). Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet* 38, 365-411.
- Stene, M.A., Babajani, M., Bhuta, S., and Cochran, A.J. (1988). Quantitative alterations in cutaneous Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin. *J Invest*

- Dermatol *91*, 125-128.
- Stiewe, T., and Pützer, B.M. (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* *26*, 464-469.
- Stott, F.J., Bates, S., James, M.C., McConnell, B.B., Starborg, M., Brookes, S., Palmero, I., Ryan, K., Hara, E., Vousden, K.H., *et al.* (1998). The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* *17*, 5001-5014.
- Straume, O., Sviland, L., and Akslen, L.A. (2000). Loss of nuclear p16 protein expression correlates with increased tumor cell proliferation (Ki-67) and poor prognosis in patients with vertical growth phase melanoma. *Clin Cancer Res* *6*, 1845-1853.
- Strauss, D.C., and Thomas, J.M. (2010). Transmission of donor melanoma by organ transplantation. *Lancet Oncol* *11*, 790-796.
- Sturm, R.A. (2002). Skin colour and skin cancer - MC1R, the genetic link. *Melanoma Res* *12*, 405-416.
- Sáenz, S., Conejo-Mir, J., and Cayuela, A. (2005). [Melanoma epidemiology in Spain]. *Actas Dermosifiliogr* *96*, 411-418.
- Sánchez-del-Campo, L., Montenegro, M.F., Cabezas-Herrera, J., and Rodríguez-López, J.N. (2009a). The critical role of alpha-folate receptor in the resistance of melanoma to methotrexate. *Pigment Cell Melanoma Res* *22*, 588-600.
- Sánchez-del-Campo, L., Otón, F., Tárraga, A., Cabezas-Herrera, J., Chazarra, S., and Rodríguez-López, J.N. (2008). Synthesis and biological activity of a 3,4,5-trimethoxybenzoyl ester analogue of epicatechin-3-gallate. *J Med Chem* *51*, 2018-2026.
- Sánchez-del-Campo, L., Tárraga, A., Montenegro, M.F., Cabezas-Herrera, J., and Rodríguez-López, J.N. (2009b). Melanoma activation of 3-o-(3,4,5-trimethoxybenzoyl)-(-)-epicatechin to a potent irreversible inhibitor of dihydrofolate reductase. *Mol Pharm* *6*, 883-894.
- Takahashi, I., Kobayashi, E., Asano, K., Yoshida, M., and Nakano, H. (1987). UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)* *40*, 1782-1784.
- Takahashi, I., Saitoh, Y., Yoshida, M., Sano, H., Nakano, H., Morimoto, M., and Tamaoki, T. (1989). UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C. II. Purification, physico-chemical properties, structural determination and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* *42*, 571-576.
- Takimoto, C.H. (1996). New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications. *Oncologist* *1*, 68-81.
- Talmadge, J.E., and Fidler, I.J. (2010). AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer Res* *70*, 5649-5669.
- Tarhini, A.A., Gogas, H., and Kirkwood, J.M. (2012). IFN- α in the treatment of melanoma. *J Immunol* *189*, 3789-3793.
- Taube, J.H., Herschkowitz, J.I., Komurov, K., Zhou, A.Y., Gupta, S., Yang, J., Hartwell, K., Onder, T.T.,

- Gupta, P.B., Evans, K.W., *et al.* (2010). Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 15449-15454.
- Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol* *84*, 988-993.
- Tian, H., and Cronstein, B.N. (2007). Understanding the mechanisms of action of methotrexate: implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis* *65*, 168-173.
- Tiwari, T.P., Bharti, S.K., Kaur, H.D., Dikshit, R.P., and Hoondal, G.S. (2005). Synergistic antimicrobial activity of tea & antibiotics. *Indian J Med Res* *122*, 80-84.
- Topalian, S.L., Sznol, M., McDermott, D.F., Kluger, H.M., Carvajal, R.D., Sharfman, W.H., Brahmer, J.R., Lawrence, D.P., Atkins, M.B., Powderly, J.D., *et al.* (2014). Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* *32*, 1020-1030.
- Trent, J.M., Buick, R.N., Olson, S., Horns, R.C., and Schimke, R.T. (1984). Cytologic evidence for gene amplification in methotrexate-resistant cells obtained from a patient with ovarian adenocarcinoma. *J Clin Oncol* *2*, 8-15.
- Tsao, H., Chin, L., Garraway, L.A., and Fisher, D.E. (2012). Melanoma: from mutations to medicine. *Genes Dev* *26*, 1131-1155.
- Tsao, H., Goel, V., Wu, H., Yang, G., and Haluska, F.G. (2004). Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol* *122*, 337-341.
- Tsao, H., and Niendorf, K. (2004). Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol* *51*, 803-808.
- Tse, A., and Moran, R.G. (1998). Cellular folates prevent polyglutamation of 5, 10-dideazatetrahydrofolate. A novel mechanism of resistance to folate antimetabolites. *J Biol Chem* *273*, 25944-25952.
- Tse, A.N., Carvajal, R., and Schwartz, G.K. (2007). Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* *13*, 1955-1960.
- Tucker, M.A., Crutcher, W.A., Hartge, P., and Sagebiel, R.W. (1993). Familial and cutaneous features of dysplastic nevi: a case-control study. *J Am Acad Dermatol* *28*, 558-564.
- Turley, R.S., Raymond, A.K., and Tyler, D.S. (2011). Regional treatment strategies for in-transit melanoma metastasis. *Surg Oncol Clin N Am* *20*, 79-103.
- Ullrich, S.E. (2007). Sunlight and skin cancer: lessons from the immune system. *Mol Carcinog* *46*, 629-633.
- Urba, W.J. (2014). At the bench: adoptive cell therapy for melanoma. *J Leukoc Biol* *95*, 867-874.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J.L., and Thody, A.J. (1995). Variants of the melanocyte-

- stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet* 11, 328-330.
- van Ede, A.E., Laan, R.F., Blom, H.J., De Abreu, R.A., and van de Putte, L.B. (1998). Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Semin Arthritis Rheum* 27, 277-292.
- Van Gele, M., Dynoodt, P., and Lambert, J. (2009). Griscelli syndrome: a model system to study vesicular trafficking. *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 268-282.
- Vestergaard, M.E., Macaskill, P., Holt, P.E., and Menzies, S.W. (2008). Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *Br J Dermatol* 159, 669-676.
- Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., and Stillman, B. (1994). The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature* 369, 574-578.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55, 5187-5190.
- Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, P.J., Sausville, E.A., and O'Connor, P.M. (1996). UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* 88, 956-965.
- Wang, Z.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R., and Mukhtar, H. (1989). Antimutagenic activity of green tea polyphenols. *Mutat Res* 223, 273-285.
- Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Warburg, O. (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123, 309-314.
- Webber, S., Bartlett, C.A., Boritzki, T.J., Hillard, J.A., Howland, E.F., Johnston, A.L., Kosa, M., Margosiak, S.A., Morse, C.A., and Shetty, B.V. (1996). AG337, a novel lipophilic thymidylate synthase inhibitor: in vitro and in vivo preclinical studies. *Cancer Chemother Pharmacol* 37, 509-517.
- Webster, J.D., Kiupel, M., and Yuzbasiyan-Gurkan, V. (2006). Evaluation of the kinase domain of c-KIT in canine cutaneous mast cell tumors. *BMC Cancer* 6, 85.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Welch, S., Hirte, H.W., Carey, M.S., Hotte, S.J., Tsao, M.S., Brown, S., Pond, G.R., Dancey, J.E., and Oza, A.M. (2007). UCN-01 in combination with topotecan in patients with advanced recurrent ovarian cancer: a study of the Princess Margaret Hospital Phase II consortium. *Gynecol Oncol* 106, 305-310.
- Wellbrock, C., Rana, S., Paterson, H., Pickersgill, H., Brummelkamp, T., and Marais, R. (2008). Oncogenic BRAF regulates melanoma proliferation through the lineage specific factor MITF. *PLoS One* 3, e2734.

- Westbroek, W., Lambert, J., Bahadoran, P., Busca, R., Herteleer, M.C., Smit, N., Mommaas, M., Ballotti, R., and Naeyaert, J.M. (2003). Interactions of human Myosin Va isoforms, endogenously expressed in human melanocytes, are tightly regulated by the tail domain. *J Invest Dermatol* 120, 465-475.
- Westbroek, W., Lambert, J., De Schepper, S., Kleta, R., Van Den Bossche, K., Seabra, M.C., Huizing, M., Mommaas, M., and Naeyaert, J.M. (2004). Rab27b is up-regulated in human Griscelli syndrome type II melanocytes and linked to the actin cytoskeleton via exon F-Myosin Va transcripts. *Pigment Cell Res* 17, 498-505.
- Wettergren, Y., Odin, E., Nilsson, S., Willen, R., Carlsson, G., and Gustavsson, B. (2005). Low expression of reduced folate carrier-1 and folylpolyglutamate synthase correlates with lack of a deleted in colorectal carcinoma mRNA splice variant in normal-appearing mucosa of colorectal carcinoma patients. *Cancer Detect Prev* 29, 348-355.
- Whetstone, J.R., and Matherly, L.H. (2001). The basal promoters for the human reduced folate carrier gene are regulated by a GC-box and a cAMP-response element/AP-1-like element. Basis for tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 276, 6350-6358.
- Whetstone, J.R., Witt, T.L., and Matherly, L.H. (2002). The human reduced folate carrier gene is regulated by the AP2 and sp1 transcription factor families and a functional 61-base pair polymorphism. *J Biol Chem* 277, 43873-43880.
- Whiteman, D.C., Whiteman, C.A., and Green, A.C. (2001). Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* 12, 69-82.
- Widlund, H.R., and Fisher, D.E. (2003). Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene* 22, 3035-3041.
- Wielinga, P., Hooijberg, J.H., Gunnarsdottir, S., Kathmann, I., Reid, G., Zelcer, N., van der Born, K., de Haas, M., van der Heijden, I., Kaspers, G., *et al.* (2005). The human multidrug resistance protein MRP5 transports folates and can mediate cellular resistance against antifolates. *Cancer Res* 65, 4425-4430.
- Williams, F.M., Murray, R.C., Underhill, T.M., and Flintoff, W.F. (1994). Isolation of a hamster cDNA clone coding for a function involved in methotrexate uptake. *J Biol Chem* 269, 5810-5816.
- Williams, J.W., Morrison, J.F., and Duggleby, R.G. (1979). Methotrexate, a high-affinity pseudosubstrate of dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 18, 2567-2573.
- Willis, S.N., and Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625.
- Wong, S.C., Zhang, L., Proefke, S.A., Hukku, B., and Matherly, L.H. (1998). Gene amplification and increased expression of the reduced folate carrier in transport elevated K562 cells. *Biochem Pharmacol* 55, 1135-1138.
- Worm, J., Kirkin, A.F., Dzhandzhugazyan, K.N., and Guldberg, P. (2001). Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast

- cancer cells. *J Biol Chem* 276, 39990-40000.
- Wu, X.S., Rao, K., Zhang, H., Wang, F., Sellers, J.R., Matesic, L.E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., and Hammer, J.A. (2002). Identification of an organelle receptor for myosin-Va. *Nat Cell Biol* 4, 271-278.
- Wölfel, T., Hauer, M., Schneider, J., Serrano, M., Wölfel, C., Klehmann-Hieb, E., De Plaen, E., Hankeln, T., Meyer zum Büschenfelde, K.H., and Beach, D. (1995). A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269, 1281-1284.
- Xiao, Z., Chen, Z., Gunasekera, A.H., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., Fesik, S., and Zhang, H. (2003). Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem* 278, 21767-21773.
- Xiao, Z., Xue, J., Sowin, T.J., Rosenberg, S.H., and Zhang, H. (2005). A novel mechanism of checkpoint abrogation conferred by Chk1 downregulation. *Oncogene* 24, 1403-1411.
- Xie, T., Nguyen, T., Hupe, M., and Wei, M.L. (2009). Multidrug resistance decreases with mutations of melanosomal regulatory genes. *Cancer Res* 69, 992-999.
- Xiong, Y., Zhang, H., and Beach, D. (1992). D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 71, 505-514.
- Yam, T.S., Hamilton-Miller, J.M., and Shah, S. (1998). The effect of a component of tea (*Camellia sinensis*) on methicillin resistance, PBP2' synthesis, and beta-lactamase production in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 42, 211-216.
- Yamaguchi, T., Hirota, K., Nagahama, K., Ohkawa, K., Takahashi, T., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2007). Control of immune responses by antigen-specific regulatory T cells expressing the folate receptor. *Immunity* 27, 145-159.
- Yang, C.S., Maliakal, P., and Meng, X. (2002). Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42, 25-54.
- Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. *Dev Cell* 14, 818-829.
- Yang, L., Pang, Y., and Moses, H.L. (2010). TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol* 31, 220-227.
- Yang, T.T., and Koo, M.W. (2000). Chinese green tea lowers cholesterol level through an increase in fecal lipid excretion. *Life Sci* 66, 411-423.
- Yasumoto, K., Mahalingam, H., Suzuki, H., Yoshizawa, M., and Yokoyama, K. (1995). Transcriptional activation of the melanocyte-specific genes by the human homolog of the mouse *Microphthalmia* protein. *J Biochem* 118, 874-881.
- Yasumoto, K., Yokoyama, K., Shibata, K., Tomita, Y., and Shibahara, S. (1994). *Microphthalmia*-associated transcription factor as a regulator for melanocyte-specific transcription of the human tyrosinase gene. *Mol Cell Biol* 14, 8058-8070.

- Ying, S., Hamdy, F.C., and Helleday, T. (2012). Mre11-dependent degradation of stalled DNA replication forks is prevented by BRCA2 and PARP1. *Cancer Res* 72, 2814-2821.
- Yoshizaki, T., Imamura, T., Babendure, J.L., Lu, J.C., Sonoda, N., and Olefsky, J.M. (2007). Myosin 5a is an insulin-stimulated Akt2 (protein kinase Bbeta) substrate modulating GLUT4 vesicle translocation. *Mol Cell Biol* 27, 5172-5183.
- Yuan, T.L., and Cantley, L.C. (2008). PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* 27, 5497-5510.
- Zaidi, M.R., Day, C.P., and Merlino, G. (2008). From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol* 128, 2381-2391.
- Zaika, A., Irwin, M., Sansome, C., and Moll, U.M. (2001). Oncogenes induce and activate endogenous p73 protein. *J Biol Chem* 276, 11310-11316.
- Zeng, H., Chen, Z.S., Belinsky, M.G., Rea, P.A., and Kruh, G.D. (2001). Transport of methotrexate (MTX) and folates by multidrug resistance protein (MRP) 3 and MRP1: effect of polyglutamylation on MTX transport. *Cancer Res* 61, 7225-7232.
- Zhang, L., Taub, J.W., Williamson, M., Wong, S.C., Hukku, B., Pullen, J., Ravindranath, Y., and Matherly, L.H. (1998). Reduced folate carrier gene expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: relationship to immunophenotype and ploidy. *Clin Cancer Res* 4, 2169-2177.
- Zhang, Y., and Xiong, Y. (2001). A p53 amino-terminal nuclear export signal inhibited by DNA damage-induced phosphorylation. *Science* 292, 1910-1915.
- Zhao, B., Bower, M.J., McDevitt, P.J., Zhao, H., Davis, S.T., Johanson, K.O., Green, S.M., Concha, N.O., and Zhou, B.B. (2002a). Structural basis for Chk1 inhibition by UCN-01. *J Biol Chem* 277, 46609-46615.
- Zhao, H., Watkins, J.L., and Piwnicka-Worms, H. (2002b). Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 14795-14800.
- Zhao, R., Assaraf, Y.G., and Goldman, I.D. (1998). A mutated murine reduced folate carrier (RFC1) with increased affinity for folic acid, decreased affinity for methotrexate, and an obligatory anion requirement for transport function. *J Biol Chem* 273, 19065-19071.
- Zhao, R., Diop-Bove, N., Visentin, M., and Goldman, I.D. (2011). Mechanisms of membrane transport of folates into cells and across epithelia. *Annu Rev Nutr* 31, 177-201.
- Zhao, R., and Goldman, I.D. (2003). Resistance to antifolates. *Oncogene* 22, 7431-7457.
- Zhao, R., and Goldman, I.D. (2013). The proton-coupled folate transporter: physiological and pharmacological roles. *Curr Opin Pharmacol* 13, 875-880.
- Zhao, R., Hanscom, M., Chattopadhyay, S., and Goldman, I.D. (2004). Selective preservation of pemetrexed pharmacological activity in HeLa cells lacking the reduced folate carrier: association with the presence of a secondary transport pathway. *Cancer Res* 64, 3313-3319.

- Zhao, R., Matherly, L.H., and Goldman, I.D. (2009a). Membrane transporters and folate homeostasis: intestinal absorption and transport into systemic compartments and tissues. *Expert Rev Mol Med* 11, e4.
- Zhao, R., Min, S.H., Wang, Y., Campanella, E., Low, P.S., and Goldman, I.D. (2009b). A role for the proton-coupled folate transporter (PCFT-SLC46A1) in folate receptor-mediated endocytosis. *J Biol Chem* 284, 4267-4274.
- Zhao, R., Qiu, A., Tsai, E., Jansen, M., Akabas, M.H., and Goldman, I.D. (2008). The proton-coupled folate transporter: impact on pemetrexed transport and on antifolates activities compared with the reduced folate carrier. *Mol Pharmacol* 74, 854-862.
- Zhao, R., Russell, R.G., Wang, Y., Liu, L., Gao, F., Kneitz, B., Edelman, W., and Goldman, I.D. (2001). Rescue of embryonic lethality in reduced folate carrier-deficient mice by maternal folic acid supplementation reveals early neonatal failure of hematopoietic organs. *J Biol Chem* 276, 10224-10228.
- Zhao, R., Titus, S., Gao, F., Moran, R.G., and Goldman, I.D. (2000). Molecular analysis of murine leukemia cell lines resistant to 5, 10-dideazatetrahydrofolate identifies several amino acids critical to the function of folylpolyglutamate synthetase. *J Biol Chem* 275, 26599-26606.
- Zhou, B.B., and Bartek, J. (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4, 216-225.
- Zhou, X.P., Gimm, O., Hampel, H., Niemann, T., Walker, M.J., and Eng, C. (2000). Epigenetic PTEN silencing in malignant melanomas without PTEN mutation. *Am J Pathol* 157, 1123-1128.
- Zou, W., and Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol* 8, 467-477.
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A.M., Tucker, M.A., Walker, G.J., Hayward, N., and Dracopoli, N.C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nat Genet* 12, 97-99.